

МИКРОБИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 579.22 : 579.26

EDN: LNXNKX

doi: 10.17072/1994-9952-2025-3-279-288



Филогенетическое разнообразие нитрилutilизирующих бактерий содового шламохранилища и их некоторые физиолого-биохимические особенности

Галина Андреевна Сыровацкая^{1✉}, Александр Юрьевич Максимов^{2, 3},
Юлия Геннадьевна Максимова^{4, 5}

^{1, 2, 4} Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

^{3, 5} Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

^{1✉} gsyrovackya@gmail.com

² almaks1@mail.ru

⁴ maks@iegm.ru

Аннотация. Исследовано филогенетическое разнообразие нитрилutilизирующих бактерий содового шламохранилища. Галоалкалотерантные изоляты, полученные при использовании ацетамида и ацетонитрила в качестве единственных источников углерода, идентифицированы методом секвенирования 16S рДНК. Определено, что изоляты принадлежат к филумам *Actinomycetota* (родам *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*) и *Pseudomonadota* (родам *Acinetobacter*, *Ensifer*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*). Установлено, что изоляты обладают нитрилгидратазной и амидазной активностью и содержат гены амидаз двух типов, а также Fe-содержащей нитрилгидратазы. Не обнаружено нитрилазной активности и генов нитрилаз, Co-содержащих нитрилгидратаз и энантиоселективных амидаз. Изоляты способны формировать биопленки. Показано, что биомасса биопленок увеличивается при снижении температуры роста.

Ключевые слова: гидролиз нитрилов, нитрилutilизирующие бактерии, содовое шламохранилище, биопленки, алкалофилы, галофилы, галоалкалотерантные бактерии, нитрилгидратаза, амидаза

Для цитирования: Сыровацкая Г. А., Максимов А. Ю., Максимова Ю. Г. Филогенетическое разнообразие нитрилutilизирующих бактерий содового шламохранилища и их некоторые физиолого-биохимические особенности // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2025. Вып. 3. С. 279–288. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2025-3-279-288>.

Благодарности: исследование выполнено в рамках государственного задания по теме «Биоразнообразие микроорганизмов в антропогенно-загрязненных экосистемах и функционально-генетические механизмы их адаптации к стрессовым условиям внешней среды», регистрационный номер 124020500028-4.

MICROBIOLOGY

Original article

Phylogenetic diversity of nitrile-utilizing bacteria of soda sludge storage facility and some of their physiological and biochemical features

Galina A. Syrovatskaya^{1✉}, Aleksandr Yu. Maksimov^{2, 3}, Yuliya G. Maksimova^{4, 5}

^{1, 2, 4} Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch RAS, Perm, Russia

^{3, 5} Perm State University, Perm, Russia

^{1✉} gsyrovackya@gmail.com

² almaks1@mail.ru

⁴ maks@iegm.ru

Abstract. The phylogenetic diversity of nitrile-utilizing bacteria from a soda sludge storage facility was studied. Haloalkalitolerant bacteria were isolated on acetamide and acetonitrile as the only carbon sources and identified by 16S rDNA sequencing. The isolates were found to belong to the phyla *Actinomycetota* (*Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Rhodococcus* spp.) and *Pseudomonadota* (*Acinetobacter*, *Ensifer*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* spp.). The isolates were found to have nitrile hydratase and amidase activity and contain genes for two types of

amidases and Fe-containing nitrile hydratase. No nitrilase activity or nitrilase genes, Co-containing nitrile hydratases, or enantioselective amidases were found. Isolates are capable of forming biofilms, and biofilm biomass increases with decreasing growth temperature.

Keywords: nitrile hydrolysis, nitrile-utilizing bacteria, soda sludge storage, biofilm, alkaliphiles, halophiles, haloalkalitolerant bacteria, nitrile hydratase, amidase

For citation: Syrovatskaya G. A., Maksimov A. Yu., Maksimova Yu. G. [Phylogenetic diversity of nitrile-utilizing bacteria of soda sludge storage facility and some of their physiological and biochemical features]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 3 (2025): pp. 279-288. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2025-3-279-288>.

Acknowledgments: the study was carried out within the framework of the state assignment on the topic “Biodiversity of microorganisms in anthropogenically polluted ecosystems and functional and genetic mechanisms of their adaptation to stressful environmental conditions”, registration number 124020500028-4.

Введение

Изучение микробного разнообразия экстремальных биотопов как естественного, так и антропогенного происхождения имеет большую перспективу для развития фундаментальной науки и биотехнологий. К щелочным и/или высокоминерализованным искусственным средам относятся щелочные сточные воды, солеотвалы, хранилища содового шлама. Содовые шламохранилища – это складированные на открытых полигонах отходы производства кальцинированной соды. Содовый шлам имеет щелочную реакцию (pH 11), содержит главным образом хлорид кальция, в нем практически отсутствуют питательные вещества, необходимые микроорганизмам, при этом он нестерилен. Методом метагеномного секвенирования было показано, что в содовом шламе обитают представители филумов *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* и некоторых других [Шилова, Максимов, Максимова, 2020].

Способность микроорганизмов к гидролизу нитрилов активно изучается на протяжении последних нескольких десятилетий. Это связано с использованием нитрилгидролизующих микроорганизмов в биотехнологиях, в частности как биокатализаторов синтеза акриламида из акрилонитрила, никотинамида из 3-цианопиридина, и с перспективой получения различных производных амидов и карбоновых кислот в фарминдустрии и химической промышленности [Debabov, Yanenko, 2011]. При этом появление нитрилтилизирующих прокариотов в биотопах естественного происхождения может не быть связано с загрязнением синтетическими нитрилами. Цианогликозиды, синтезируемые растениями, обусловливают распространение нитрилтилизирующих бактерий в природе [Egelkamp, 2019].

Утилизация нитрилов микроорганизмами может происходить двумя метаболическими путями: одностадийным, при гидролизе нитрилазой (КФ 3.5.5.1) до соответствующих карбоновых кислот, и двустадийным, гидратацией нитрилов до амидов нитрилгидратазой (КФ 4.2.1.84) с последующим гидролизом до карбоновой кислоты амидазой (КФ 3.5.1.4). Биокатализатором этого процесса может быть как фермент, так и целая микробная клетка. Биокатализаторы, используемые в промышленности, в основном нейтрофильны, хотя возникает интерес к нитрилтилизирующим бактериям, выделенным из экстремальных биотопов, т. к. они могут быть полезны при осуществлении цельноклеточного катализа в жестких условиях: при повышенной температуре, крайних значениях pH, в присутствии органических растворителей.

Есть немногочисленные примеры выделения нитрилгидролизующих прокариотов из экстремальных сред. *Natronocella acetinitrilica* gen. nov. sp., способный к утилизации ацетонитрила как источника углерода и азота при экстремально высоком pH и среднем уровне минерализации, был выделен из осадка содового озера [Sorokin et al., 2007a]. Консорциум, состоящий из нового представителя актинобактерий и гаммапротеобактерий рода *Marinospirillum*, осуществлял утилизацию изобутиронитрила при pH 10 [Sorokin et al., 2007b]. Представитель рода *Halomonas*, выделенный из засоленных содовых почв, утилизировал 2-фенилпропионитрил в качестве источника азота при pH 10 [Chmura et al., 2008]. Облигатно алкалофильный галотолерантный штамм *Bacillus alkalinotrilicus* sp. nov., растущий в присутствии изобутиронитрила, был выделен из солончаковой почвы [Sorokin, Van Pelt, Tourova, 2008]. Алкалотолерантный штамм *R. pyridinivorans* NIT-36, продуцирующий нитрилгидратазу, был выделен из горячего источника [Singh et al., 2017]. Выделены не только прокариотические, но и эукариотические микроорганизмы, способные к трансформации нитрилов в экстремальных условиях. «Черные дрожжи» *Exophiala oligosperma* R1 растут при pH 4, используя фенилацетонитрил в качестве единственного источника углерода, азота и энергии [Rustler et al., 2008]. Солеустойчивый штамм дрожжей *Meyerozyma guilliermondii* LM2, способный конвертировать бензонитрил в среде, содержащей до 1.5 M NaCl, был выделен из подводных отложений [Serra et al., 2019]. Галофильные и галотолерантные микроорганизмы, утилизирующие нитрилы, могут функционировать как биокатализаторы в присутствии органических растворителей при низкой активности воды. Внутриклеточные ферменты алкалофилов часто проявляют наибольшую активность в нейтральном диапазоне pH, однако алкало- и галотолерантные нитрилтилизирующие бактерии могут служить цельноклеточным биокатализатором в условиях, отличающихся от физиологических.

Загрязненные среды антропогенного происхождения могут быть источником выделения штаммов, устойчивых как к высоким концентрациям токсикантов, так и к экстремальным воздействиям окружающей среды. Кроме этого, такие микроорганизмы обычно обладают механизмами неспецифической устойчивости, которые позволяют им приспособливаться к воздействию самых разных неблагоприятных факторов. В связи с этим изучение филогенетического разнообразия нитрилтилизирующих бактерий в таком биотопе, как содовое шламохранилище, представляется достаточно важным. Целью настоящей работы явилось выделение и идентификация нитрилтилизирующих бактерий, изучение их биохимических свойств и способности к биопленкообразованию под воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды.

Материалы и методы исследования

Объекты исследования и условия культивирования

Бактериальные изоляты выделяли из проб содового шлама и грунта старой карты содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод» (г. Березники, Пермский край) на агаризованной минеральной среде (0.05% NaCl, pH 7.2) с 10 mM ацетамидом (ацд) или 0.25% ацетонитрилом (ацн) в качестве единственных источников углерода и азота. Грунт отбирали с поверхности, на глубине 5 и 10 см, также для выделения использовали объединенную пробу. Сочетание высокой концентрации соли, щелочной среды и ацетамида/ацетонитрила как единственных источников энергии не позволило получить изоляты на агаризованной среде.

Идентификация полученных изолятов

Видовая идентификация бактериальных изолятов была проведена путем ПЦР-анализа с праймерами к генам 16S рРНК, сконструированными на основе последовательностей, представленных в базе данных GenBank, и синтезированными ООО «ЕвроГен» (г. Москва). Препараты хромосомной ДНК получали методом щелочного лизиса. Амплификацию ДНК проводили с применением термостабильной Та-полимеразы производства ООО «СибЭнзим» (г. Новосибирск) на термоциклире Т3 («Biometra», Германия). Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР-реакции проводили в 1.2–1.5% агарозном геле в трисбортном буфере при напряженности поля 5 В/см. Для оценки молекулярной массы фрагментов ДНК использовали молекулярные маркеры 1 kb и 100 b (ООО «СибЭнзим» и Axigen®). Визуализацию полос и документирование данных осуществляли после окрашивания геля бромистым этидием с использованием системы гельдокументации BioDocAnalyze («Biometra», Германия). Очистку ПЦР-продукта перед секвенированием осуществляли двумя способами: с помощью смеси ферментов ExoSAPMix (Fermentas Life Sciences) и аппарата E-Gel («Invitrogen», США) согласно инструкции фирмы-производителя. Секвенирование проводили на приборе Genetic Analyzer 3500xl («Applied Biosystems», США), следуя инструкциям фирмы-производителя. Гомологию полученных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК с известными генами микроорганизмов анализировали с использованием программного пакета BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi); программы Chromas lite 2.1. Сравнение нуклеотидных последовательностей проводили с применением программ ClustalW 2.0.9 и YACWGUI 1.2.

Определение нитрилгидратазной и амидазной активности изолятов

Нитрилгидратазную активность определяли по образованию акриламида и акриловой кислоты из акрилонитрила. Изоляты выращивали до стационарной фазы, культуральную жидкость (1 мл) центрифугировали 10 мин при 4500 g, клетки отмывали калий-фосфатным буфером (pH 7.2) и центрифугировали повторно. Клеточный преципитат суспендировали в 1 мл фосфатного буфера и вносили акрилонитрил до конечной концентрации 0.3 M, через 24 ч реакцию останавливали добавлением 50 мкл HCl. Амидазную активность определяли по образованию акриловой кислоты из акриламида. Реакцию проводили 24 ч, субстрат добавляли в концентрации 50 mM. Концентрацию акриламида и акриловой кислоты в реакционной среде определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Infinity II JC 1260 (Agilent, Германия) с колонкой Synergi 4u Hydro-RP 80A (250 × 4.6 мм). В качестве подвижной фазы использовали 25 mM NaH₂PO₄ с 5% ацетонитрила, скорость потока составляла 0.500 мл/мин при 25°C, детекцию проводили при длине волн 200 нм.

Детекция генов амидаз, нитрилгидратаз и нитрилаз

Амплификацию ДНК проводили с применением термостабильной Та-SE ДНК-полимеразы (ООО «СибЭнзим», г. Новосибирск) на термоциклире Т100 («Biometra», Германия). Для анализа генов использованы разработанные ранее олигонуклеотидные праймеры [Демаков и др., 2009а; Демаков и др., 2009б; Павлова, Неустроева, Максимов, 2011]. Режим амплификации включал начальный цикл денатурации –

1 мин при 94°C; денатурацию, 94°C – 20 с; отжиг, 53° – 30 с; элонгацию, 72°C – 60 с; (35 циклов) и завершающий этап – 60 с при 72°C. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов проводили в 1.2% агарозном геле в трис-бортатном буфере при напряженности электрического поля 6 В/см. Праймеры для выявления генов ферментов, участвующих в трансформации нитрилов и амидов, представлены в табл. 1.

Таблица 1

Праймеры для выявления генов амидаз, нитрилгидратаз, нитрилаз
[Primers for detecting the genes of amidases, nitrile hydratases, and nitrilases]

Выявляемые гены	Праймер	Последовательность, 5'-3'	Длина ПЦР-продукта
Амидаза <i>R. erythropolis</i> (E12517) и <i>R. rhodochrous</i> N-774 (X54074)	ARh499f ARh1002r	GAAGCAGGTGGATCATCCGG TCCGTGGCGATCACGTTCCA	503
Амидаза <i>R. erythropolis</i> (M88714)	AReR-1 AReR-2	ATGCGACACGGTGACATCTCCTCGA TTACGCTTCGACGGTCTTCTCGAC	1094
Амидаза <i>R. rhodochrous</i> J1 (D16207)	AmiJ1-1 AmiJ1-2	ATGTCTTCGTTGACTCCCCCAATT TTATGTCAGGGTGCCGGCTGCAGC	1547
Амидаза <i>Rhodococcus</i> sp. (A19131)	ARsp-1 ARsp-2	ATGGGCTTGCATGAAC TGACGCTCG TCAAAGCGGCGCCAGTCGCGGCCA	1388
α-субъединица Со-нитрилгидратазы <i>R. rhodochrous</i> J1 (D67027)	NHCoAF NHCoAR	GTGATACATATGAGCGAGCACGTCAAT ATGCATCATACGATCACTTCCTG	611
β-субъединица Со-нитрилгидратазы <i>R. rhodochrous</i> J1 (D67027)	NHCoBF NHCoBR	GTGATACATATGGATGGTATCCACGAC ATGCATCACGCAGAGATCAGGTA	689
α-субъединица Fe-нитрилгидратазы <i>R. rhodochrous</i> N-774, (X54074)	NHFeAF NHFeAR	CATATGTCAGTAACGATCGAC ATGCATCAGACGGTGGAACCTG	623
β-субъединица Fe-нитрилгидратазы <i>R. rhodochrous</i> N-774 (X54074)	NHFeBF NHFeBR	CATATGGATGGAGTACACGAT ATGCATCAGGCCGCAGGCTCGAG	638
Нитрилаза <i>R. rhodochrous</i> K22 (D12583)	NitK22F NitK22R	ATGTCCAGCAATCCAGAGCTCAAGTACAC CTAGGCCTCCGCCTGGCCC	1151
Нитрилаза <i>R. rhodochrous</i> J1 (D67026)	NitJ1F NitJ1R	ATGGTCGAATACACAAACACATTCAAAG TCAGATGGAGGCTGTCGCC	1100

Определение массивности биопленок

Биопленки выделенных изолятов выращивали в 96-луночном полистироловом планшете (Медполимер, Россия) в БТН-бульоне (Биотехновация, Россия), варьируя условия культивирования. Для изучения влияния минерализации в среду добавляли 5, 10, 50 г/л NaCl, pH среды доводили с помощью гидроксида натрия (NaOH), культивирование проводили при температуре 8, 15, 30 и 37°C. Биопленки в среде с различной концентрацией соли и pH выращивали при температуре 30°C. Влияние температуры на образование биопленок изучали на среде БТН с pH 7. После 7–10 суток инкубации планктонные клетки удаляли из лунок декантацией, дважды отмывали биопленку 200 мкл калий-фосфатным буфером и определяли массивность образованной биопленки. Биопленку окрашивали 0.1% кристаллическим фиолетовым в течение 40 мин в темноте, удаляли краситель, отмывали 1 раз калий-фосфатным буфером и экстрагировали краситель 200 мкл 96% спирта. Формирование биопленок оценивали по оптической плотности раствора красителя при λ 540 нм на планшетном ридере Infinite M1000 pro, «TECAN» (Швейцария).

Статистическую обработку проводили с использованием t-критерия Стьюдента, различия считали значимыми при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

Из содового шлама и восстанавливающихся после эксплуатации грунтов территории содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод» на минеральной среде с ацетамидом и ацетонитрилом в качестве единственного источника углерода и энергии были выделены изоляты нитрил- и амидо-тилизирующих бактерий, которые идентифицировали методом секвенирования гена 16S рДНК. Результаты идентификации представлены в табл. 2.

Таблица 2

Идентификация нитрилгидролизующих бактерий, выделенных на территории содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод»

[Identification of nitrile hydrolyzing bacteria isolated on the territory of the soda sludge storage facility of JSC Bereznikovsky Soda Plant]

Изолят	Источник выделения	Вид	Типовой штамм	Сходство, %	Количество прочт. нукл-ов	Таксономия
Источник углерода – ацетонитрил						
CCO31 (ацн)	Грунт, старая карта	<i>Rhizobium radiobacter</i>	ATCC 19358(T)	100.00	809	<i>Bacteria, Pseudomonadota, Alphaproteobacteria, Rhizobiales, Rhizobiaceae, Rhizobium</i>
CCOП 1 (ацн)	Поверхность грунта, старая карта	<i>Rhizobium nepotum</i>	39/7(T)	99.75	807	
CCOП (ацн)	Поверхность грунта, старая карта	<i>Pseudomonas mandelii</i>	NBRC 103147(T)	99.87	782	<i>Bacteria, Pseudomonadota, Gammaproteobacteria, Pseudomonadales, Pseudomonadaceae, Pseudomonas</i>
CCOЗ 1.1(ацн)	Грунт, старая карта	<i>Microbacterium hatanonis</i>	JCM 14558(T)	98.42	699	<i>Bacteria, Actinomycetota, Actinomycetes, Micrococcales, Microbacteriaceae, Microbacterium</i>
OIII2 / 5Э	Шлам, новая карта	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	JCM 15477(T)	99.42	537	<i>Bacteria, Actinomycetota, Actinomycetes, Corynebacteriales, Nocardiaceae, Rhodococcus</i>
CCOЗ ₅ 2 / 6Э	Грунт, 5 см глубины, старая карта	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	NBRC 15567(T)	99.84	651	
Источник углерода – ацетамид						
CCO31 (ацд)	Грунт, старая карта	<i>Ensifer morelensis</i>	Lc04(T)	98.99	701	<i>Bacteria, Pseudomonadota, Alphaproteobacteria, Hyphomicrobiales, Rhizobiaceae, Ensifer</i>
CCOЗ 1.3 (ацд)	Грунт, старая карта	<i>Ensifer morelensis</i>	Lc04(T)	99.87	781	
CCOЗ ₁₀ 4 (ацд)	Грунт, старая карта, 10 см глубины	<i>Ensifer morelensis</i>	Lc04(T)	100.00	847	
CCOЗ 1.2 (ацд)	Грунт, старая карта	<i>Pseudomonas</i> sp.	DSM 18928(T)	99.53	853	<i>Bacteria, Pseudomonadota, Gammaproteobacteria, Pseudomonadales, Pseudomonadaceae, Pseudomonas</i>
CCOЗ 3(ацд)	Грунт, старая карта	<i>Pseudomonas mandelii</i>	NBRC 103147(T)	98.00	751	
CCOЗ 1.4 (ацд)	Грунт, старая карта	<i>Rhodococcus</i> sp.	JCM 15477(T)	100	666	<i>Bacteria, Actinomycetota, Actinomycetes, Corynebacteriales, Nocardiaceae, Rhodococcus</i>
CCOЗ ₁₀ 3	Грунт, старая карта, 10 см глубины	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	NBRC 15567 (T)	99.85	701	

Окончание табл. 2

Изолят	Источник выделения	Вид	Типовой штамм	Сходство, %	Количество прочт. нукл-ов	Таксономия
ССОЗ ₁₀₁ (ацд)	Грунт, старая карта, 10 см глубины	<i>Arthrobacter globiformis</i>	NBRC 12137(T)	100.00	771	<i>Bacteria, Actinomycetota, Actinomycetes, Micrococcales, Micrococcaceae, Arthrobacter</i>
ССОП 1 (ацд)	Грунт, старая карта, поверхность	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	DSM 30006(T)	99.87	876	<i>Bacteria, Pseudomonadota, Gammaproteobacteria, Pseudomonadales, Moraxellaceae, Acinetobacter</i>
ССОП 1.2 (ацд)	Грунт, старая карта, поверхность	<i>Rhizobium nepotum</i>	39/7(T)	99.77	876	<i>Bacteria, Pseudomonadota, Alphaproteobacteria, Rhizobiales, Rhizobiaceae, Rhizobium</i>

Нитрилтилизирующие бактерии были выделены главным образом из грунта старой карты шламохранилища, который характеризовался высокой минерализацией и был слабощелочным (рН 8) [Шилова, Максимов, Максимова, 2020]. Ранее из различных сред содового шламохранилища (содового шлама, грунта восстанавливавшихся территорий) были выделены бактериальные штаммы, обладающие различной гидролитической активностью [Шилова, Максимов, Максимова, 2021] и устойчивостью к широкому спектру рН и высокой минерализации [Maksimova, Eliseeva, Maksimov, 2024]. На грунте старой карты шламохранилища наблюдалось восстановление растительности. Содовый шлам состоял из ионов кальция, хлора, карбонатов и гидрокарбонатов и имел рН 11, что приводило к значительному снижению микробного разнообразия по сравнению с грунтом старой карты. Из содового шлама на ацетонитриле был изолирован только один штамм галоалкотолерантных родококков. Выделенные изоляты принадлежали филумам *Actinomycetota* и *Pseudomonadota*.

Определена активность выделенных изолятов. Показано, что изоляты обладают как амидазной активностью, которая проявляется при гидролизе акриламида, так и нитрилгидратазной активностью, выявляющейся при трансформации акрилонитрила. Когда субстратом реакции является акрилонитрил, в реакционной смеси обнаруживается как акриламид, так и акриловая кислота, что подтверждает работу нитрилгидратазно-амидазной ферментативной системы. При гидролизе акриламида в реакционной среде детектировали акриловую кислоту. Ферментативные активности изолятов представлены в табл. 3. Нитрилгидратазная активность обычно значительно превышает амидазную, особенно у селекционированных продуцентов, однако у большинства изолятов, выделенных с территории содового шламохранилища, амидазная активность была выше нитрилгидратазной.

Известно, что у родококков встречается несколько структурно-различных групп амидаз. Из щелочно-высокоминерализованного биотопа были выделены бактериальные изоляты различной филогенетической принадлежности, в том числе изоляты родококков. Методом ПЦР определено наличие в геномах исследованных алкалотолерантных изолятов генов, соответствующих генам амидаз следующих типов: амидаза *R. erythropolis* (E12517) и *R. rhodochrous* N-774 (X54074), алифатическая амидаза *R. erythropolis* (M88614, Genbank), энантиоселективная амидаза *R. erythropolis* (AY026386, Genbank). Установлено, что в ДНК всех исследованных экстремотолерантных изолятов есть гены амидаз 1-го и 2-го типов (рис. 1), но не обнаруживается энантиоселективная амидаза. У всех штаммов обнаружены гены Fe-содержащей нитрилгидратазы (рис. 2) и отсутствует Со-содержащая. Гены нитрилаз не обнаружены.

Образование биопленок является адаптивной реакцией бактерий. Ранее нами было показано, что *Rhodococcus qingshengii* IEGM 1416 (изолят ОП2 / 5Э) и *R. erythropolis* IEGM 1417 (изолят ССОЗ₂ / 6Э) формировали более массивные биопленки при увеличении рН и снижении температуры, а *R. qingshengii* IEGM 1416 – еще и при повышении концентрации соли в среде [Maksimova, Syrovatskaya, Maksimov, 2025]. Изучено биопленкообразование выделенных на ацетамиде и ацетонитриле изолятов нитрилтилизирующих бактерий. Изоляты формировали биопленки, биомасса которых, оцененная по ОП₅₄₀ экстрагированного красителя кристаллического фиолетового, составляла от 0.2 до 0.4 единиц. Наибольшую биомассу (ОП₅₄₀ = 0.4–0.5) отмечали у биопленок *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas mandelii* и

Rhizobium nepotum. Оценили воздействие 5–50 г/л хлорида натрия, 7–12 pH и 8–37°C на формирование биопленок у изолятов, проявивших наибольшую способность к биопленкообразованию (рис. 3).

Таблица 3

Нитрилгидратазные и амидазные активности бактериальных изолятов, выделенных на территории содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод»

[Nitrile hydratase and amidase activities of bacterial isolates isolated on the territory of the soda sludge storage facility of JSC Bereznikovsky Soda Plant]

Изолят	Субстрат реакции (фермент)	Акрилонитрил (нитрилгидратаза)	Акриламид (амида)
		Активность фермента, ммоль/г/ч	
ССОП (ацн)		1.63	2.84
ССОП 2 (ацд)		3.31	33.38
ССОЗ ₁₀ 2 (ацд)		27.19	14.21
ССОЗ ₁₀ 4 (ацд)		15.23	42.99
ССОЗ ₁₀ 3 (ацд)		26.79	10.73
ССОЗ ₅ 1 (ацн)		6.50	28.19
ССОЗ 2 (ацн)		26.14	38.03
ССОЗ 2 (ацд)		23.67	37.61
ССОЗ ₁₀ (ацн)		1.89	16.18
ССОЗ 4 (ацд)		19.09	49.05
ССОЗ ₁₀ 1 (ацд)		0.97	0.87
ССОП 1 (ацд)		0.42	3.39
ССОЗ 3 (ацд)		19.76	33.23
ССОЗ 1 (ацн)		7.77	14.49
ССОЗ 3 (ацн)		1.60	17.41
ССОЗ 1 (ацд)		33.24	22.80

Примечание: независимые эксперименты по культивированию изолятов и определению ферментативной активности их клеток проведены в двухкратной повторности. В таблице приведены результаты единичного эксперимента.

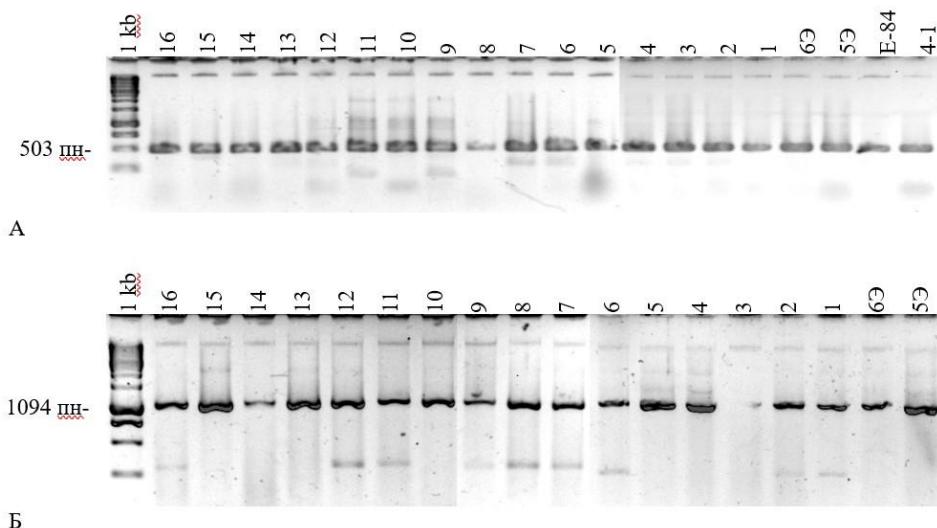


Рис. 1. ПЦР-продукты, соответствующие генам амидаз, гомологичных таковым из *R. erythropolis*, E12517, *R. rhodochrous* N-774, X54074 (А) и *R. erythropolis*, M88714 (Б).

Изолят: 1 – ССОП (ацн), 2 – ССОП2 (ацд), 3 – ССОЗ₁₀2 (ацд), 4 – ССОЗ₁₀4 (ацд), 5 – ССОЗ₁₀3 (ацд) 6 – ССОЗ₅1 (ацн), 7 – ССОЗ2 (ацн), 8 – ССОЗ2 (ацд), 9 – ССОЗ10 (ацд), 10 – ССОЗ4 (ацд), 11 – ССОЗ101 (ацд), 12 – ССОП1 (ацд), 13 – ССОЗ3 (ацд), 14 – ССОЗ1 (ацн), 15 – ССОЗ3 (ацн), 16 – ССОЗ1 (ацд), *R. qingshengii* IEGM 1416 (5Э), *R. erythropolis* IEGM 1417 (6Э), *R. erythropolis* E-84, *R. erythropolis* 4-1

[PCR products corresponding to the genes of amidases homologous to those from *R. erythropolis*, E12517, *R. rhodochrous* N-774, X54074 (A) and *R. erythropolis*, m88714 (B).]

Isolates: 1 – SSOP (aen), 2 – SSOP2 (acd), 3 – SSOZ102 (acd), 4 – SSOZ104 (adc), 5 – SSOZ103 (adc), 6 – SSOZ51 (adc), 7 – SSOZ2 (adc), 8 – SSOZ2 (adc), 9 – SSOZ10 (adc), 10 – SSOZ4 (adc), 11 – SSOZ101 (adc), 12 – ssop1 (ADC), 13 – ccos3 (ADC), 14 – ccos1 (ADC), 15 – ccos3 (ADC), 16 – ccos1 (ADC), *R. qingshengii* IEGM 1416 (5E), *R. erythropolis* IEGM 1417 (6E), *R. erythropolis* E-84, *R. erythropolis* 4-1]

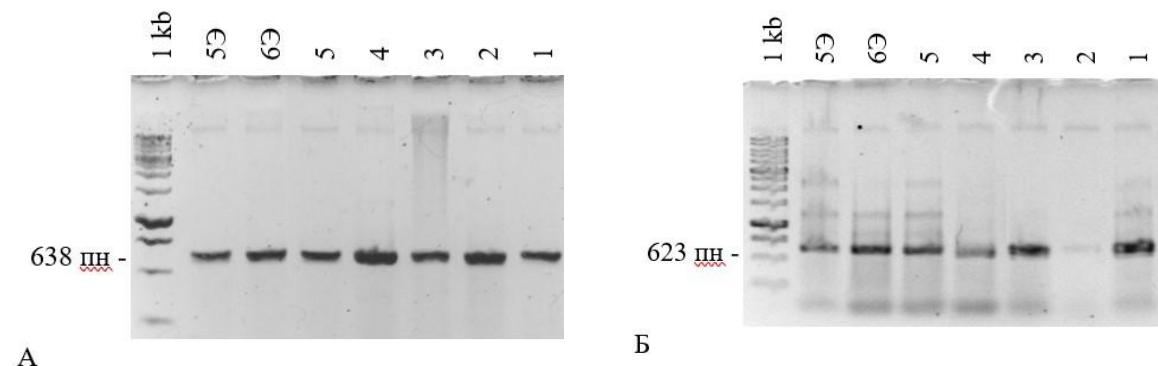


Рис. 2. ПЦР-продукты, соответствующие генам альфа (А) и бета (Б) субъединиц Fe-содержащей нитрилгидратазы, гомологичных таковым из *R. rhodochrous* N-774, X54074.

Обозначение изолятов как на рис. 1

[PCR products corresponding to the alpha (A) and beta(B) subunit genes of Fe-containing nitrile hydratase, homologous to those of *R. rhodochrous* N-774, X54074.

Designation of isolates as shown in Fig. 1]

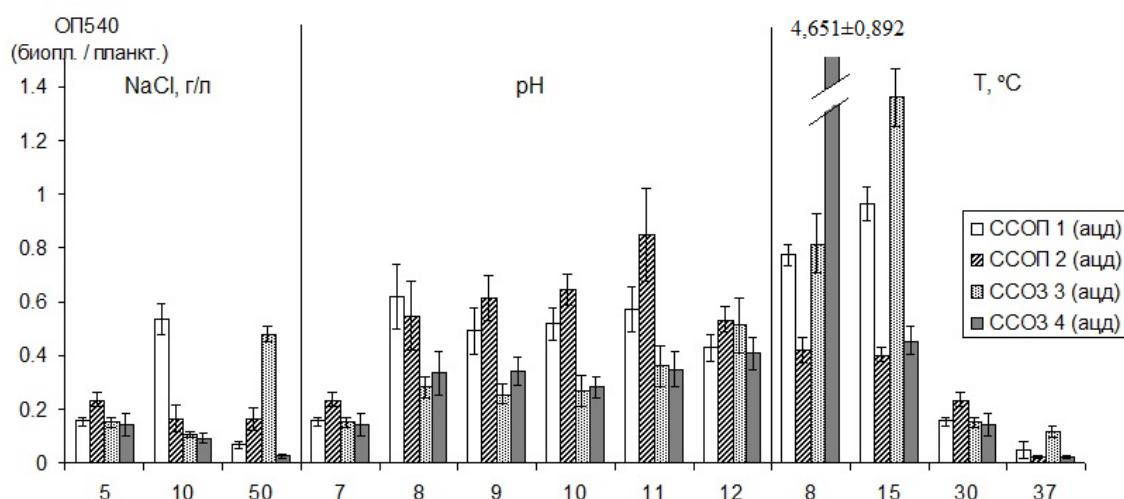


Рис. 3. Влияние концентрации NaCl, pH и температуры на биопленкообразование изолятов нитрилтилизирующих бактерий содового шламохранилища

[Influence of NaCl concentration, pH, and temperature on biofilm formation of isolates of nitrilutylizing bacteria from soda sludge storage]

Высокие концентрации соли подавляли рост изолятов, только у *A. calcoaceticus* ССОП 1 и *P. mandelii* значительно увеличивалась биомасса биопленки в среде с 10 и 50 г/л NaCl соответственно. Влияние pH было более выражено для *R. neptunum*, биомасса биопленок увеличивалась при возрастании pH от 7 до 11, но снижалась при pH 12. У всех изолятов образование биопленок было достоверно выше в щелочной среде ($p < 0.05$), чем при pH 7. Температурное воздействие на биопленкообразование было сходным у всех изученных изолятов: при температуре 37°C формирование биопленок подавлялось, тогда как planktonная культура росла достаточно активно (OP₅₄₀ = 0.7–0.8). Снижение температуры до 8–15°C интенсифицировало процесс образования биопленок.

Заключение

Таким образом, с поверхности, глубины 5–10 см и из объединенной пробы грунта старой карты содового шламохранилища на ацетамиде и ацетонитриле как единственном источнике углерода были выделены изоляты нитрилтилизирующих бактерий, относящиеся к филумам *Actinomycetota* и *Pseudomonadota*. Единственный штамм родококков, способный к утилизации нитрилов, был выделен из содового шлама с экстремально высокими pH и минерализацией. Изоляты обладали активностью нитрилгидратазы и амидазы, причем амидазная активность была выше нитрилгидратазной. Обнаружены гены неэнантиоселективных амидаз двух типов и Fe-содержащей нитрилгидратазы. Выделенные изоляты

формировали биопленки, биомасса которых увеличивалась при снижении температуры роста. Воздействие других изученных факторов (концентрации NaCl и pH) на образование биопленок было штаммоспецифично.

Список источников

1. Демаков В.А. и др. ПЦР-анализ генов ферментов гидролиза нитрилов карбоновых кислот // Вестник Пермского университета. 2009а. № 10 (36). С. 73–78. EDN: PAVDQJ.
2. Демаков В.А. и др. Почвенные актинобактерии рода *Rhodococcus*, обладающие высокой амидазной активностью // Вестник Пермского университета. 2009б. № 10 (36). С. 79–83. EDN: PAVDQT.
3. Павлова Ю.А., Неустроева А.Н., Максимов А.Ю. Сравнительный анализ последовательностей генов амидаз почвенных актинобактерий рода *Rhodococcus* // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. Т. 13, № 5-3. С. 272–276. EDN: PFLHQP.
4. Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г. Выделение и идентификация алкалотолерантных бактерий с гидролитической активностью из содового шламохранилища // Микробиология. 2021. Т. 90, № 2. С. 155–165. DOI: 10.31857/s0026365621020130. EDN: KLWPKV.
5. Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г. Изменения микробиома как индикатор восстановления природных сред содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод» // Вода и экология: проблемы и решения. 2020. № 1 (81). С. 84–94. DOI: 10.23968/2305-3488.2020.25.1.84-94. EDN: MXZOXG.
6. Chmura A. et al. Utilization of arylaliphatic nitriles by haloalkaliphilic *Halomonas nitrilicus* sp. nov. isolated from soda soils // Applied Microbial and Cell Physiology. 2008. Vol. 81. P. 371–378. DOI: 10.1007/s00253-008-1685-x. EDN: LKZBGV.
7. Debabov V.G., Yanenko A.S. Biocatalytic hydrolysis of nitriles // Review Journal of Chemistry. 2011. Vol. 1, № 4. P. 376–394. DOI: 10.1134/S2079978011030010. EDN: OFRMQP.
8. Egelkamp R. et al. Impact of nitriles on bacterial communities // Frontiers in Environmental Science. 2019. Vol. 7. Art. 103. DOI: 10.3389/fenvs.2019.00103.
9. Maksimova Yu., Eliseeva A., Maksimov A. Metabolic and morphological aspects of adaptation of alkaliophilic *Bacillus aequorororis* 5-DB and alkali-tolerant *Bacillus subtilis* ATCC 6633 to changes in pH and mineralization // International Journal of Microbiology. 2024. Vol. 2024, № 1. Art. 3087296. DOI: 10.1155/2024/3087296.
10. Maksimova Yu.G., Syrovatskaya G.A., Maksimov A.Yu. Nitrile-hydrolyzing haloalkalitolerant rhodococci of soda sludge storage // Indian Journal of Microbiology. 2025. DOI: 10.1007/s12088-024-01445-w. EDN: PPKSHZ.
11. Rustler S. et al. Characterisation of the substrate specificity of the nitrile hydrolyzing system of the acidotolerant black yeast *Exophiala oligosperma* R1 // Studies in Mycology. 2008. Vol. 61, № 1. P. 165–174. DOI: 10.3114/sim.2008.61.17.
12. Serra I. et al. Marine microorganisms for biocatalysis: selective hydrolysis of nitriles with a salt-resistant strain of *Meyerozyma guilliermondii* // Marine Biotechnology. 2019. Vol. 21. P. 229–239. DOI: 10.1007/s10126-019-09875-0.
13. Singh P. et al. Enhanced production of Nhase of alkali stable *Rhodococcus pyridinivorans* Nit 36 and its application in acrylamide production // IJBPAS. 2017. Vol. 6, № 2. P. 278–299.
14. Sorokin D.Y. et al. Acetonitrile degradation under haloalkaline conditions by *Natronocella acetinitrilica* gen. nov., sp. nov. // Microbiology. 2007а. Vol. 153. P. 1157–1164. DOI: 10.1099/mic.0.2006/004150-0. EDN: MKICDJ.
15. Sorokin D.Y. et al. Microbial isobutyronitrile utilization under haloalkaline conditions // Applied and Environmental Microbiology. 2007б. Vol. 73, № 17. P. 5574–5579. DOI: 10.1128/AEM.00342-07. EDN: KGVDZB.
16. Sorokin D.Y., Van Pelt S., Tourova T.P. Utilization of aliphatic nitriles under haloalkaline conditions by *Bacillus alkalinitrilicus* sp. nov. isolated from soda solonchak soil // FEMS Microbiology Letters. 2008. Vol. 288, № 2. P. 235–240. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01353.x. EDN: LLIXUV.

References

1. Demakov V.A. et al. [PCR assay of enzymatic genes involved in hydrolysis of carboxylic acid nitriles]. *Vestnik Permskogo universiteta*. No. 10(36) (2009а): pp. 73-78. (In Russ.). EDN: PAVDQJ.
2. Demakov V.A. et al. [Soil actinobacteria of genus *Rhodococcus* having high amidase activity]. *Vestnik Permskogo universiteta*. No. 10(36) (2009б): pp. 79-83. (In Russ.). EDN: PAVDQT.
3. Pavlova Yu. A. et al. [Comparative analysis of gene sequences of amidases of soil actinobacteria *Rhodococcus*]. *Izvestija Samarskogo naučnogo centra Rossijskoj akademii nauk*. V. 13, No. 5(3) (2011): pp. 272-276. (In Russ.). EDN: PFLHQP.

4. Shilova A.V. et al. [Isolation and Identification of Alkalitolerant Bacteria with Hydrolytic Activity from a Soda Sludge Storage]. *Microbiology*. V. 90 (2021): pp. 166-175. (In Russ.). DOI: 10.1134/S0026261721020120. EDN: KLWPKV.
5. Shilova A.V. et al. [Microbiome changes as an indicator of the recovery of natural environments at the soda sludge storage facility of Berezniki soda plant]. *Voda i ekologija: problemy i rešenija*. No. 1(81) (2020): pp. 84-94. DOI: 10.23968/2305-3488.2020.25.1.84-94. (In Russ.). EDN: MXZOXG.
6. Chmura A. et al. Utilization of arylaliphatic nitriles by haloalkaliphilic *Halomonas nitrilicus* sp. nov. isolated from soda soils. *Applied Microbial and Cell Physiology*. V. 81, No. 2 (2008): pp. 371-378. DOI: 10.1007/s00253-008-1685-x.
7. Debabov V.G., Yanenko A.S. Biocatalytic hydrolysis of nitriles. *Review Journal of Chemistry*. V. 1, No. 4 (2011): pp. 376-394. DOI: 10.1134/S2079978011030010. EDN: OFRMQP.
8. Egelkamp R. et al. Impact of nitriles on bacterial communities. *Frontiers in Environmental Science*. V. 7 (2019): Art. 103. DOI: 10.3389/fenvs.2019.00103.
9. Maksimova Yu., Eliseeva A., Maksimov A. Metabolic and morphological aspects of adaptation of alkaliphilic *Bacillus aequororius* 5-DB and alkali-tolerant *Bacillus subtilis* ATCC 6633 to changes in pH and mineralization. *International Journal of Microbiology*. V. 2024, No. 1 (2024): Art. 3087296. DOI: 10.1155/2024/3087296.
10. Maksimova Yu.G. et al. Nitrile-hydrolyzing haloalkalitolerant rhodococci of soda sludge storage. *Indian Journal of Microbiology*. (2025). DOI: 10.1007/s12088-024-01445-w. EDN: PPKSHZ.
11. Rustler S. et al. Characterisation of the substrate specificity of the nitrile hydrolyzing system of the acidotolerant black yeast *Exophiala oligosperma* R1. *Studies in Mycology*. V. 61, No. 1 (2008): pp. 165-174. DOI: 10.3114/sim.2008.61.17.
12. Serra I. et al. Marine microorganisms for biocatalysis: selective hydrolysis of nitriles with a salt-resistant strain of *Meyerozyma guilliermondii*. *Marine Biotechnology*. V. 21 (2019): pp. 229-239. DOI: 10.1007/s10126-019-09875-0.
13. Singh P. et al. Enhanced production of Nhase of alkali stable *Rhodococcus pyridinivorans* Nit 36 and its application in acrylamide production. *IJPBAS*. V. 6, No. 2 (2017): pp. 278-299.
14. Sorokin D.Y. et al. Acetonitrile degradation under haloalkaline conditions by *Natronocellao acetinitriliica* gen. nov., sp. nov. *Microbiology*. V. 153 (2007a): pp. 1157-1164. DOI: 10.1099/mic.0.2006/004150-0. EDN: MKICDJ.
15. Sorokin D.Y. et al. Microbial isobutyronitrile utilization under haloalkaline conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. V. 73, No. 17 (2007b): pp. 5574-5579. DOI: 10.1128/AEM.00342-07. EDN: KGVDZB.
16. Sorokin D.Y., Van Pelt S., Tourova T.P. Utilization of aliphatic nitriles under haloalkaline conditions by *Bacillus alkalinitriliicus* sp. nov. isolated from soda solonchak soil. *FEMS Microbiology Letters*. V. 288, No. 2 (2008): pp. 235-240. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01353.x. EDN: LLIXUV.

Статья поступила в редакцию 25.08.2025; одобрена после рецензирования 28.08.2025; принятая к публикации 18.09.2025.

The article was submitted 25.08.2025; approved after reviewing 28.08.2025; accepted for publication 18.09.2025.

Информация об авторах

Г. А. Сыровацкая – аспирант;
А. Ю. Максимов – канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотр.;
Ю. Г. Максимова – д-р биол. наук, доцент, зав. лабораторией.

Information about the authors

G. A. Syrovatskaya – postgraduate student;
A. Yu. Maksimov – Ph.D. in Biology, Associate Professor, Senior Research Fellow;
Yu. G. Maksimova – doctor of biology, Associate Professor, head of the laboratory.

Вклад авторов:

Сыровацкая Г. А. – экспериментальная работа; написание текста.
Максимов А. Ю. – концепция исследования; частично экспериментальная работа.
Максимова Ю. Г. – научное руководство; концепция исследования; редактирование текста.

Contribution of the authors:

Syrovatskaya G. A. – experimental work; writing the text.
Maksimov A. Yu. – research concept; partially experimental work.
Maksimova Yu. G. – scientific supervision; research concept; text editing.