

СЕМЕНОВА ЕКАТЕРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**НИТРИТРЕЗИСТЕНТНЫЕ БАКТЕРИИ РОДА *HALOMONAS*
В ПРОЦЕССАХ АНОКСИЧЕСКОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

03.00.23 – биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа – 2009

Работа выполнена в лаборатории прикладной микробиологии Учреждения Российской академии наук Института биологии Уфимского научного центра РАН (ИБ УНЦ РАН)

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Усанов Николай Глебович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Киреева Наиля Ахняфовна

доктор биологических наук, профессор
Чернов Владислав Моисеевич

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН (г. Пермь)

Защита диссертации состоится **24 апреля 2009 года в 14.00 часов** на заседании Объединенного диссертационного совета ДМ 002.136.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г. Уфа, проспект Октября, д. 69. Тел. (347) 235-62-47 E-mail: ib@anrb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института биологии Уфимского научного центра РАН и на официальном сайте <http://www.anrb.ru/inbio/sovet.html>

Автореферат разослан 20 марта 2009 г.

Ученый секретарь Объединенного диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент

Р.В.Уразгильдин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Промышленные биотехнологические процессы, основанные на использовании микроорганизмов, практически всегда связаны с их культивированием, осуществляемым различными способами. Одним из основных требований, предъявляемых к микробным технологиям, является создание асептических условий, при одновременной подаче и диспергировании в питательной среде свежих порций стерильного кислорода (воздуха) в сочетании с отводом отработанного газа (Kane, 1993; McNeil and Harvey, 2008; Schallmey et al., 2004). Реализация этого требования возможна лишь при использовании сложного технологического оборудования и сопряжена с высокими энергетическими и экономическими затратами. Одним из путей их снижения является использование методов анаэробного культивирования, осуществляемых, например, при ферментации облигатно анаэробных бактерий или микроорганизмов, обладающих бродильным типом метаболизма, архей, дрожжей (Morris, 1994; Stal and Moezelaar, 1997). Недостатком биотехнологий данного типа являются их сравнительно низкие скорость и эффективность. Вместе с тем, известны микроорганизмы, обладающие аэробным типом дыхания, и, одновременно, способные к энергетическому метаболизму при наличии в питательной среде других окислителей, например, нитратов, перхлоратов (Stal and Moezelaar, 1997; Straub et al., 2000; Zumft, 1992). Процессы их ферментации относятся к аноксическим и применяются, главным образом, в технологии очистки сточных вод, при этом скорость деления клеток приближается к уровню аэрируемого культивирования (Casella and Payne, 1996; Stepanov and Korpela, 1997). Присутствие NaNO_3 в среде устраняет необходимость стерильной аэрации и диспергирования воздуха, что приводит к соответствующему снижению затрат. Вместе с тем, для получения высоких конечных концентраций биомассы в аноксических процессах требуются значительные стартовые концентрации окислителя в среде, например, нитратов. С другой стороны, восстановление нитратов микроорганизмами до газообразного азота происходит с образованием и промежуточным накоплением в среде токсичных нитритов, способных ингибировать рост рабочей культуры в очень низких концентрациях – 0,05 - 0,1% NaNO_2 (Chung et al., 2004). Таким образом, использование метаболизма полной денитрификации в классическом варианте не целесообразно из-за низких результирующих концентраций клеток. Сравнительно недавно (Усанов с соавт., 2002, 2003) обнаружены алкалогалотолерантные микроорганизмы, относящиеся к роду *Halomonas* (Vreeland et al., 1980), устойчивые к высоким концентрациям нитритов и осуществляющие активную денитрификацию NO_3^- и NO_2^- до газообразного

азота. Представляется вероятным и возможным их использование в качестве базовых культур (хостов) для генетической модификации, что позволит осуществлять их культивирование без применения азотации воздухом, заменив его адекватными концентрациями NaNO_3 . Можно предположить, что вследствие высокой токсичности нитрита, который неизбежно будет накапливаться в среде, подобные системы будут устойчивы к контаминации. В этом случае процесс культивирования можно будет осуществлять в биореакторах упрощенного типа, представляющих собой герметичную емкость с устройством для термостатирования, снабженных маломощной циркуляционной мешалкой, что, в свою очередь, приведет к значительному снижению капитальных, эксплуатационных и энергетических затрат.

Цель исследования

Выделение и изучение нитритрезистентных бактерий рода *Halomonas* для процессов аноксической ферментации и получения рекомбинантных белков в условиях неингибированного нитратного и нитритного дыхания.

Задачи исследования

1. Выделить из природных ниш обитания культуры денитрифицирующих бактерий, способные к активному аноксическому росту на минимальных субстратах (цитрат натрия) в присутствии высоких концентраций нитратов и нитритов, определить их таксономическое положение с использованием современных методов сравнительного филогенетического анализа структуры 16S рПНК.

2. Изучить физиологические и биохимические свойства, а также денитрифицирующую активность выделенных штаммов, их устойчивость к высоким концентрациям токсичных нитритов, выявить перспективные рабочие изоляты бактерий, способных к активному аноксическому дыханию.

3. Подобрать модельный вектор, кодирующий зеленый флуоресцентный белок, и провести трансформацию одного из активных изолятов рекомбинантной ДНК, испытать его в режиме периодической и проточной ферментации.

4. Изучить поведение культур наиболее активных денитрификаторов в моделях технологии очистки образцов питьевой воды из подземных источников, загрязненной анионами нитратов и нитритов.

Научная новизна

Впервые обнаружены два типа акцепции нитрит анионов, используемых в качестве единственного акцептора электронов при росте культур денитрификаторов рода *Halomonas* в средах с высокой щелочностью ($\text{pH} > 9$) – диффузия и активный транспорт.

Для обозначения предположительно новой группы денитрификаторов, способных к активной акцепции NO_2^- , предложен термин “**нитритофильные**” культуры.

Определены полные последовательности гена 16S рНК для 5 изолятов галомонад, проведена реконструкция моделей филогенетических древ и определено их положение в роду *Halomonas*.

Подобраны условия трансформации культуры рода *Halomonas* sp. IB-G4 плазмидой pHS15G2, несущей ген зеленого флуоресцентного белка (GFP), в результате чего получены 4 клона трансформантов.

Впервые проведена трансформация денитрификаторов рода *Halomonas* рекомбинантной ДНК без использования хелперной плазмиды.

Качественно показана экспрессия плазмиды в хосте в процессе анаэробного культивирования трансформанта G4.4 в условиях неингибированного нитратного и нитритного дыхания.

Практическая значимость

Создана коллекция штаммов *Halomonas*, развивающихся в анаэробических условиях на минимальном субстрате (цитрате), способных к одновременному активному росту и денитрификации в присутствии высоких концентраций нитрита натрия (до 8% масс.).

Полные последовательности генов 16S рНК пяти культур депонированы в базе данных EMBL (European Molecular Biology Laboratory)/GenBank и доступны в сети Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) под номерами AM490135, AM490136, AM490137, AM490138, AM490139.

Установлены кинетические параметры анаэробического культивирования штамма *Halomonas* sp. IB-G4 в присутствии нитрата или нитрита в качестве единственного акцептора электронов – максимальная удельная скорость роста на нитрате $\mu_{\max} = 0,8 \text{ ч}^{-1}$, на нитрите $\mu_{\max} = 0,9 \text{ ч}^{-1}$.

Показана принципиальная возможность и перспективность применения нитритофильных галомонад в процессах тонкой очистки питьевой воды, загрязненной анионами нитратов и нитритов.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на ряде научных форумов: межвузовской научно-технической конференции «Актуальные проблемы технических, естественных и гуманитарных наук» (Уфа, 2006), XIV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2007), межрегиональной школеконференции «Биомика – наука XXI века» (Уфа, 2007), III Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы экологии Южного Урала» (Оренбург, 2007), региональной конференции молодых ученых с международным участием «Современные проблемы экологии, микробиологии и иммунологии» (Екатеринбург – Пермь, 2007), II Международной

школе молодых ученых «Эмбриология, генетика и биотехнология» (Уфа, 2007), Международной научной конференции «Проблемы биоэкологии и пути их решения (Вторые Ржавитинские чтения)» (Саранск, 2008).

Конкурсная поддержка работы

Исследования поддержаны грантом Республики Башкортостан молодым ученым и молодежным научным коллективам «Экономически эффективные системы для получения рекомбинантных белков на основе нитритофильных бактерий рода *Halomonas*» (№ 21 от 28.01.2008); грантом Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере «Новая парадигма ферментации» (№ ГР 01200850086) по программе «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» («У.М.Н.И.К.»).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 1 – в журнале, рекомендованном ВАК РФ для публикаций материалов кандидатских работ.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, изложения результатов, выводов, приложений и списка цитируемой литературы, содержащего 241 ссылку. Работа изложена на 154 страницах машинописного текста, содержит 28 рисунков и 17 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроорганизмы. Объектами исследования служили галоалкалофильные нитриттолерантные бактерии рода *Halomonas* из коллекции Института биологии УНЦ РАН, а также вновь выделенные из природных мест обитания изоляты.

Скрининг и культивирование. Выделение из почвенных образцов нитритрезистентных бактерий, предположительно относящихся к роду *Halomonas*, осуществляли методом накопительных культур в анаэробных условиях на селективных средах с последующим пассажированием для получения чистой культуры. Селективные среды, обозначенные GF (CGF), имели следующий состав, г/л: дрожжевой экстракт – 10 (цитрат натрия – 15), KH_2PO_4 – 4, Na_2CO_3 – 2, NaCl – 10, NaNO_2 – 20; pH 9,2 – 9,4. Дальнейшее исследование полученных культур проводили на аналогичных питательных средах при температуре 30 – 37°C. Аноксический рост культур изучали в специальных стеклянных пробирках с завинчивающимися крышками, заполненных до верха питательной средой. Аэробное культивирование проводили в конических колбах объемом 250

мл на воздушно-термостатируемых качалках типа УВМТ-12-250 при скорости перемешивания 150 – 200 об/мин.

Морфология клетки. Морфологию, подвижность и размеры клеток исследовали с помощью фазовой оптической и сканирующей зондовой микроскопии на микроскопах Carl Zeiss (Германия) и Solver Pro-M (NT-MDT, г. Зеленоград, Россия).

Фенотипическая характеристика. Изучение физиолого-биохимических характеристик исследуемых микроорганизмов проводили, руководствуясь требованиями к описанию новых групп бактерий семейства *Halomonadaceae* (Arahal et al., 2007), а также методами, описанными в руководствах: «Определитель бактерий Берджи» (1997), «Методы общей бактериологии» (Герхардт и др., 1984), «Практикум по микробиологии» (Нетрусов и др., 2005).

Филогенетический анализ. Выделение ДНК проводили методом фенольной экстракции (Wilson, 2001). Последовательности 16S рРНК генов (1463 – 1507 п.о.) были получены методом ПЦР, с использованием концевых праймеров 16SF27 и 16SR1512 и реакционной смеси, содержащей стандартные концентрации дНТФ и *Taq*-полимеразы (Fermentas, Литва) и ДНК-матрицу. Полимеразную реакцию проводили в амплификаторе MasterCycler Personal (Eppendorf, Германия). Секвенирование гена 16S рРНК проводили на секвенаторе Perkin-Elmer ABI PRISM™ 373 с использованием универсальных для большинства прокариот праймеров. Анализ полученных последовательностей штаммов IB-NN3-2с, IB-O18, IB-O7-1, IB-O7-6, IB-G4 и построение филогенетических древ были выполнены с помощью программ BioEdit (Hall, 2007) и TREECON (Van de Peer and De Wachter, 1994).

Трансформация плазмидной ДНК. Для трансформации штамма *Halomonas* sp. IB-G4 использовали плазмидный вектор рHS15G2, любезно предоставленный профессором Constantin Drainas (University of Ioannina Department of Chemistry Biochemistry Lab, Греция). Трансформацию проводили методом электропорации в электропораторе MicroPulser (Bio-Rad, США). Компетентные клетки подвергали действию электрического импульса напряжением 2,5 кВ в течение 5 мсек. Напряженность электрического поля составила 12,5 кВ/см.

Ферментация. Аноксическое культивирование рабочего штамма галомонад проводили в непрерывном и периодическом режиме в стеклянном реакторе с рабочим объемом 160 мл, оборудованном магнитной мешалкой (60 – 100 об/мин), насосами подачи стерильной питательной среды и отбора культуральной жидкости, рубашкой для поддержания постоянной температуры, а также патрубком для отвода образующегося азота.

Определение анионного состава. Качественный и количественный анализ анионного состава образцов воды и культуральной жидкости проводили методом высокоэффективного капиллярного электрофореза (ВЭКЭФ) на приборе АКИ «Нанофор 01» (г. Санкт-Петербург, Россия), в кварцевом капилляре длиной $l = 75$ см, внутренний диаметр $d_{\text{вн}} = 70$ мкм; при рабочем напряжении 11 кВ; детектирование – не прямое в ультрафиолетовой области с длиной волны $\lambda = 254$ нм; буферный раствор – хроматный электролит (5 мМ оксида хрома (VI), 20 мМ диэтанолamina, 1,65 мМ N-цетил-N,N,N-триметиламмония бромид). Статистически достоверная чувствительность метода по нитрит аниону составляла 0,5 мг/л.

Статистическая обработка экспериментальных данных. Статистическую обработку результатов экспериментов проводили стандартными методами дисперсионного и корреляционного анализа с помощью программы Microcal Origin 7.5 Pro.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение из природных источников нитритрезистентных культур рода *Halomonas*, их морфологическая и физиолого-биохимическая характеристика

Скрининг денитрифицирующих бактерий, предположительно относящихся к роду *Halomonas*, проводили методом накопительных культур на жидких щелочных средах в анаэробных условиях. Фактором селекции служил NaNO_2 , вносимый в питательную среду в качестве акцептора электронов в концентрации 2% масс. Накопительные культуры инкубировали при 37°C, 48 ч. Пробы, демонстрирующие активное образование газообразного азота, высевали на щелочной питательный агар. Было обследовано 24 природных образца, включавших пробы чернозема (Челябинская и Кировская обл.), песка и литорального грунта с прибрежных зон Красного и Черного морей, ила со дна содовых и соленых озер (Республика Бурятия и Оренбургская обл.), почвы, отобранные в районах горячих источников (Республика Бурятия и Камчатка). Всего были выделены 21 денитрифицирующий изолят: 10 на богатой

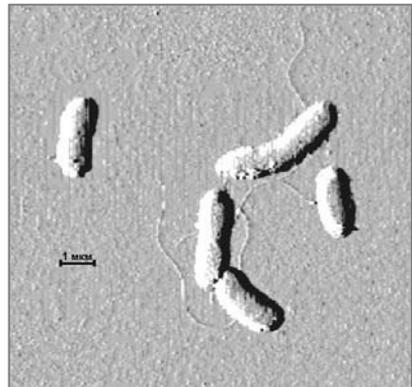


Рисунок 1. Клетки нитритрезистентной культуры *Halomonas* sp. IB-G4.

Таблица 1. Сравнительная фенотипическая характеристика некоторых нитритрезистентных изолятов, классических видов рода *Halomonas* (*H. elongata*, *H. variabilis*) и денитрифицирующих галомонад, имеющих наиболее высокое сродство по 16S рРНК (*H. desiderata*, *H. halodenitrificans*)

Характеристика	IB-I6	IB-G4	IB-O7-6	IB-O18	IB-NN3-2с	IB-O7-1	<i>H. elongata</i> ¹	<i>H. variabilis</i> ¹	<i>H. desiderata</i> ¹	<i>H. halodenitrificans</i> ¹
Морфология	палочки	палочки	палочки	палочки	палочки	палочки	палочки	палочки	палочки	палочки
Подвижность	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
Пигментация	беж.	прозрач.	бел.	бел.	беж.	бел.	бел.	беж.	беж.	беж.
Окраска по Граму	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Факульт. анаэроб	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+
Каталаза	+	+	+	+	+	+	НД	НД	+	НД
Восстановление NO ₃ ⁻ до NO ₂ ⁻	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+
Денитрификация	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+
Потребность в Na ⁺ , М	0,001	0,051	0,068	0,204	0,034	0,034	НД	НД	+	НД
Диапазон рН	6,5-11,5	7,0-11,5	7,0-11,5	7,0-10,5	7,0-11,5	6,5-11,5	5-10	6-9	7-11	5-10
Температура, °С	6-50	6-48	6-48	6-45	6-48	6-45	4-45	15-37	10-48	5-37
Концентрация NaCl, %, рН 9,4	0-18	0,1-18	0,2-15	1-18	0-20	0-20	0-20	1-25	0-18	3-20

Примечание. НД – нет данных; + положительная реакция; – отрицательная реакция.

¹ По литературным данным (Arahal et al., 2002; Berendes et al., 1996; Mata et al., 2002).

накопительной среде (субстрат – дрожжевой экстракт) и 11 на минимальном субстрате (с цитратом натрия). Полученные штаммы были объединены в коллекцию нитритрезистентных денитрификаторов и использованы для дальнейшей работы. Все культуры коллекции представляли собой грамотрицательные факультативно анаэробные подвижные палочки размером $(0,7 \div 1,0) \times (1,5 \div 2,5)$ мкм (рис. 1), проявлявшие каталазную и оксидазную активность, не сбрасывавшие сахара, активно окислявшие спирты, органические кислоты и другие соединения в аноксических условиях в присутствии 1 – 3% $\text{NaNO}_2 / \text{NaNO}_3$ в качестве единственного акцептора электронов. Одновременно все культуры являлись умеренными галофилами (рост до 20% NaCl) и нуждались в Na^+ для роста (исключение составил штамм IB-16). Температурный интервал и диапазон pH для роста большинства изолятов составляли соответственно $+6 \div +48$ °C и $\text{pH } 7,0 \div 11,5$. Некоторые биохимические и культуральные свойства выделенных нами нитритрезистентных культур и некоторых типовых штаммов рода *Halomonas* представлены в таблице 1. Учитывая совокупность культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков, все вновь выделенные бактерии предварительно были отнесены к роду *Halomonas* (Bergey's Manual, 2005; Mata et al., 2002).

Денитрифицирующая активность нитритрезистентных галомонад

Известно, что содержание NaNO_2 в нейтральных средах (как и NaNO_3 , из которого образуется нитрит) ограничено концентрацией 1,5 – 3 г/л (Гильванова и Усанов, 2003; Chung et al., 2004). В отличие от известных денитрификаторов, полученные нами культуры галомонад обладали устойчивостью и способностью к восстановлению сравнительно высоких концентраций нитрита натрия. Максимум содержания NaNO_2 в средах, на которых наблюдался рост наших изолятов, варьировал в пределах от 30 до 80 г/л (табл. 2), при оптимуме 10 – 15 г/л.

В процессе определения минимального порога концентрации нитрита, как единственного акцептора электронов, было обнаружено, что 13 изолятов способны к аноксическому росту и денитрификации в щелочных условиях даже при низких концентрациях NaNO_2 (до 0,2 г/л). Все они восстанавливали это соединение до концентраций, не детектируемых методами ВЭКЭФ. Вместе с тем, также были определены 8 изолятов, **не способных** к росту при содержании нитрита в среде менее 0,2 – 1,0 г/л (табл. 2), но развивающихся при наличии более высоких концентраций этого окислителя. Наиболее требовательным к концентрации нитрита в среде оказался штамм IB-O7-6, восстанавливающий NaNO_2 лишь при его концентрациях в питательных средах выше 2,6 г/л.

Скорость денитрификации для каждой культуры определяли двумя методами: по объему газообразных продуктов (главным образом, N_2),

Таблица 2. Рост культур *Halomonas* sp. в условиях денитрификации

Штамм	Диапазон концентраций NaNO ₂ , г/л; pH 9,4	Остаточный нитрит ¹ , г/л	Штамм	Диапазон концентраций NaNO ₂ , г/л; pH 9,4	Остаточный нитрит ¹ , г/л
J1	0,1 – 50	0	O7-1	0,1 – 80	0
Ar4	1 – 50	0,7	O7-2c	0,1 – 80	0
559	1 – 80	1,0	O4c	0,1 – 80	0
I6	0,1 – 50	0	O18-1c	1 – 80	0,8
G4	0,1 – 80	0	NN2c	0,1 – 30	0
O7-1d	1 – 80	0,7	NN5c	0,1 – 80	0
O7-5	0,1 – 80	0	NN3-1c	0,5 – 50	0,5
O7-6	3 – 50	2,6	NN3-2c	0,1 – 80	0
O18	0,5 – 80	0,5	S1c	0,1 – 50	0
O18-3	0,2 – 30	0,16	S9c	0,1 – 30	0
			SL3c	0,1 – 80	0

¹ Остаточная концентрация нитрит анионов в КЖ после окончания роста культуры.

выделявшихся в результате денитрификации нитрита натрия в заданный промежуток времени и с помощью ВЭКЭФ. В первом случае опыты выполняли в 10 мл стерильных медицинских шприцах, в которые помещали 2 мл инокулированной питательной среды с 10 г/л NaNO₂ и инкубировали при 37°C. Объем выделившегося газа фиксировали по выдвигению штока. Параметры образования газов различными штаммами представлены в таблице 3.

С целью количественной оценки динамики денитрификации использовали метод ВЭКЭФ, с помощью которого в процессе аноксического роста культуры IB-G4 через равные интервалы времени определяли остаточную концентрацию нитрит анионов в среде. Скорость восстановления нитрита в благоприятных условиях достигала 5,5 мМ NO₂⁻/л среды в час, что в несколько раз превышало известные значения (Chung et al., 2004; Francis and Mankin, 1977).

На основе полученных данных выявлены штаммы, отличавшиеся высокой скоростью денитрификации нитрита (или нитрата) натрия. Для более подробного изучения процесса аноксического культивирования, а также в качестве предполагаемого хоста для генетической модификации был выбран штамм *Halomonas* sp. IB-G4. Эта культура активно развивалась на средах, содержащих до 80 г/л NaNO₂, и обладала высокой скоростью денитрификации, протекавшей до недетектируемых методом ВЭКЭФ концентраций.

Таблица 3. Динамика образования газообразных продуктов культурами *Halomonas* sp. в результате осуществления нитритного дыхания

Штамм	Скорость газообразования, мл/сут	Максимальный объем газа, мл	Штамм	Скорость газообразования, мл/сут	Максимальный объем газа, мл
J1	1,6	3,6	O7-1	1,0	4,2
Ar4	1,0	2	O7-2c	0,8	4,0
559	1,2	2,8	O4c	1,0	3,2
I6	1,0	3,4	O18-1c	1,1	3,4
G4	1,6	3,7	NN2c	1,3	4,1
O7-1d	1,0	2,6	NN5c	1,0	3,3
O7-5	1,1	3,3	NN3-1c	0,9	3,1
O7-6	1,5	3,1	NN3-2c	1,4	4,5
O18	1,7	3,8	S1c	0,9	3,7
O18-3	1,1	2,1	S9c	0,5	3,3
			SL3c	0,5	4,2

Филогенетическая позиция нитритрезистентных бактерий

Согласно полученным данным анализа секвенированных последовательностей гена 16S рРНК все наши культуры входят в γ -подгруппу протеобактерий и принадлежат к роду *Halomonas*. Филогенетические взаимоотношения изолятов нитриттолерантных бактерий с другими галомонадами представлены в виде древа на рисунке 2. Обнаружено, что выделенные нами культуры располагаются в третьей группе галомонад “ungrouped *Halomonas*” (Arahal et al., 2002). Уровень сходства последовательностей 16S рРНК изучаемых изолятов внутри этой выборки находился в пределах 92,5 – 98,4%. Ближайшим родственником для наших штаммов оказался *Halomonas desiderata* (Berendes et al., 1996) с уровнем сходства последовательностей 98 – 98,4%.

Получение рекомбинантного штамма *Halomonas* sp. IB-G4 для анаэробического культивирования

Для создания модельной системы синтеза рекомбинантного белка мы использовали плазмидный вектор pHS15G2 (Douka et al., 2001), несущий ген внутриклеточного зеленого флуоресцентного белка (GFP). Селективным признаком при скрининге трансформантов служила устойчивость к антибиотикам – стрептомицину и ампициллину. В качестве хоста использовали рабочий штамм *Halomonas* sp. IB-G4, чувствительный к ампициллину и стрептомицину в концентрациях выше 40 мкг/мл.

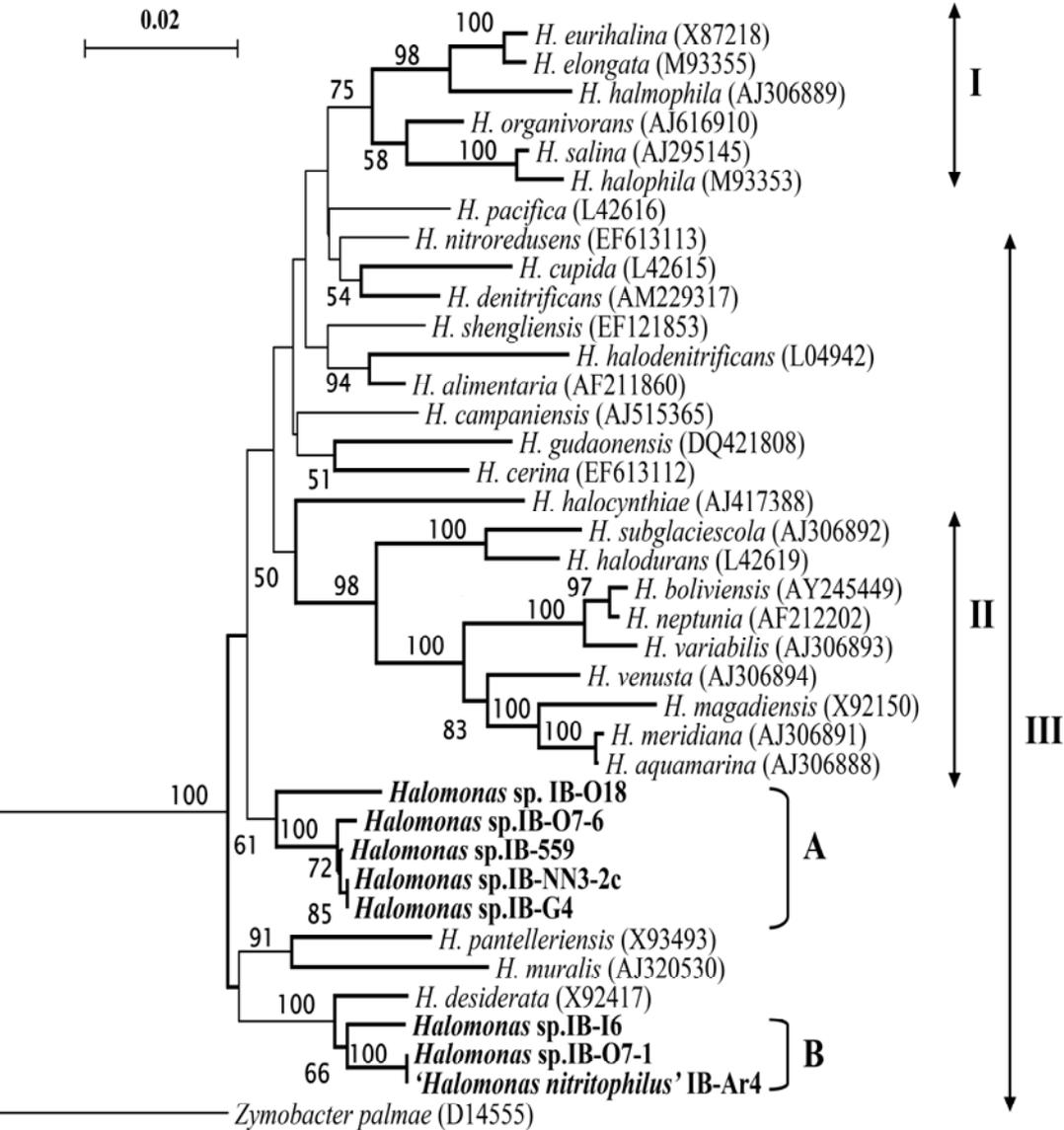


Рисунок 2. Филогенетическая позиция нитритрезистентных культур *Halomonas* (III группа *Halomonas* по Aghal et al., 2002).

Были получены 4 клона трансформантов, которые обозначены как IB-G4.4, IB-G4.5, IB-G4.6, IB-G4.7. После трансформации клоны выращивали анаэробно на питательной среде GF. Экспрессию GFP наблюдали после инкубации суточной культуры трансформантов при 4 °С в течение 24 часов. Зеленый флуоресцентный белок экстрагировали из биомассы 3,5 М раствором хлорида натрия и регистрировали интенсивность флуоресценции на спектрофлуориметре СМ – 2203 (г. Минск) (рис. 3). Пик флуоресценции клеточного экстракта установлен в области $\lambda = 475$ нм, что соответствовало излучению мутантного флуоресцентного белка, так называемого α GFP (Patterson et al., 1997).

Наличие плазмиды в клетках трансформантов установлено как при аэробном культивировании, так и в анаэробических условиях. Для этого культуры трансформантов выращивали аэробно и в условиях денитрификации на питательной среде GF при температуре 37°С. Биомассу суточных культур лизировали, полученную тотальную ДНК разделяли электрофорезом в 0,8% геле агарозы. Плазмидная ДНК rHS15G2 обнаруживалась в клетках всех трансформантов независимо от условий культивирования (рис. 4).

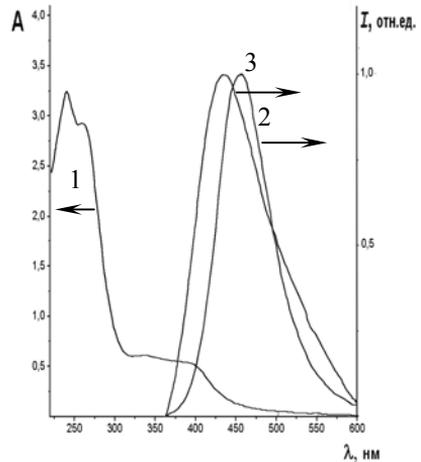


Рисунок 3. Спектры поглощения (1) и флуоресценции клеточного экстракта клона *Halomonas* sp. IB-G4.4 (2) и питательной среды LB2 (3).

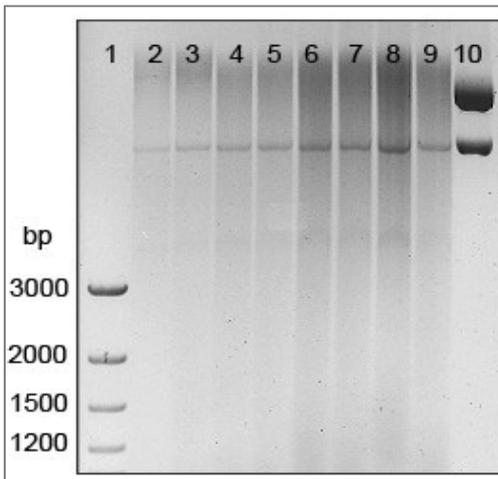


Рисунок 4. Результаты гелеэлектрофореза лизатов трансформированных клеток: 1 – ДНК маркер, 2 - 5 – примеры трансформантов *Halomonas* sp. IB-G4 аэробных условиях роста, 6 - 9 – то же в анаэробических условиях, 10 – контроль (плазмидный вектор rHS15G2).

На примере GFP доказана возможность создания генетически модифицированных штаммов денитрифицирующих галомонад для эффективного синтеза рекомбинантных белков в условиях анаэробической ферментации.

Определение основных параметров анаэробического культивирования

Для определения наиболее эффективного состава питательной среды для анаэробического культивирования нами исследована интенсивность роста рабочего штамма *Halomonas* sp. IB-G4 при различном сочетании концентраций (% масс.) субстрата (S) и акцептора электронов (N). В качестве источника углерода использовали дрожжевой экстракт, а источником кислорода служил нитрат натрия. В ходе опыта «анаэробные» пробирки, заполненные стерильной средой GF с различным соотношением S:N, одновременно инокулировали 12-ти часовой культурой галомонад и инкубировали при 37°C. Во время экспоненциальной фазы роста культуры измеряли оптическую плотность КЖ (OD_{600}). Через 7 – 10 суток инкубации определяли остаточное содержание нитратов и нитритов в КЖ методом ВЭКЭФ. По результатам эксперимента установлено, что количество восстанавливаемого азота практически не зависит от исходной концентрации нитрата, а изменяется только при увеличении содержания субстрата (рис. 5). При этом, было также отмечено, что увеличение концентрации дрожжевого экстракта выше 2% масс. уже не влияет на степень восстановления NO_3^- . В эксперименте было установлено, что наилучшие условия культивирования достигаются при соотношении донора и акцептора электронов S:N = 1:1.

Культивирование рабочего штамма на питательных средах с различным количеством субстрата и акцептора, но при постоянном соотношении S:N = 1:1 позволило определить близкие к оптимальным концентрации дрожжевого экстракта и $NaNO_3$, которые составили $S_{opt} = 1\%$ масс. и $N_{opt} = 1\%$ масс. соответственно (рис. 6). В этих условиях достига-

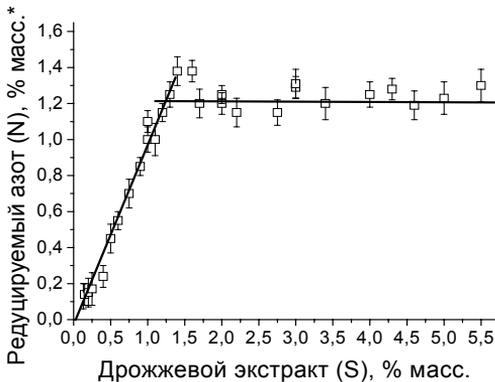


Рисунок 5. Зависимость количества восстанавливаемого нитрата (N) культурой *Halomonas* sp. IB-G4 от содержания источника углерода (S) в среде культивирования в условиях денитрификации.
* Концентрация оксианионов азота в пересчете на $NaNO_3$.

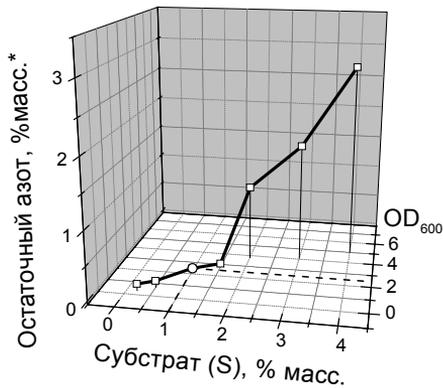


Рисунок 6. Зависимость оптической плотности и содержания остаточного азота в КЖ от концентрации субстрата при культивировании *Halomonas* sp. IB-G4 на среде с соотношением S:N = 1:1.

лись стабильность системы аноксического роста, достаточно высокая оптическая плотность культуральной жидкости и полная утилизация нитрат и нитрит анионов.

Оптимизацию условий ферментации по температуре, pH, присутствию молекулярного кислорода проводили на основе определения продолжительности лаг-фазы. В эксперименте одновременно была задействована серия вариантов условий культивирования. В качестве четырех факторов варьирования были выбраны: температура, pH, концентрация сульфида натрия, количество вносимого инокулята (табл. 4).

Содержание остальных компонентов ферментационной среды было постоянным. Анализ результатов, представленных в таблице 4, показал, что крайне негативно на скорости роста рабочего штамма сказывается отклонение температуры и pH среды культивирования от нормальных для этого штамма значений. Внесение сульфида натрия для снижения редокс-потенциала питательной среды практически не оказывало влияния на рост бактерий. Положительное воздействие на снижение продолжительности лаг-фазы оказывало увеличение количества вносимого инокулята до 10% об.

Таблица 4. Выбор оптимальных параметров аноксического культивирования штамма *Halomonas* sp. IB-G4

Номер опыта	Факторы варьирования				Продолжительность лаг-фазы, ч.	Оптическая плотность КЖ через 12 часов роста
	Температура, °С	pH	Na ₂ S, % масс.	Инокулят, % об.		
1 (контроль)	37	9,5	0	1	6	0,4
2	30	9,5	0	1	10	0,2
3	45	9,5	0	1	14	0,2
4	37	10	0	1	9	0,2
5	37	10,5	0	1	12	0,2
6	37	9,5	0,005	1	6	0,4
7	37	9,5	0,01	1	5,5	0,4
8	37	9,5	0,015	1	5,5	0,4
9	37	9,5	0,02	1	6	0,4
10	37	9,5	0	5	2,5	1,4
11	37	9,5	0	10	2	2,1

В результате проведенных экспериментов были выявлены наилучшие значения показателей аноксического культивирования рабочего штамма *Halomonas* sp. IB-G4 на питательной среде с дрожжевым экстрактом в качестве источника углерода и с нитратом натрия в качестве единственного акцептора электронов, обеспечивающие наименьшую продолжительность лаг-фазы и наибольшую интенсивность роста и денитрификации. Этому соответствовали следующие параметры: концентрация дрожжевого экстракта 1% масс., концентрация нитрата натрия 1% масс., рН = 9,5, температура 37°C, количество инокулята 10% об.

Периодическое и непрерывное культивирование рабочего штамма в аноксических условиях

Процесс аноксической ферментации рабочего штамма проводили на лабораторной установке для аноксического культивирования. Для сравнения скоростей роста и развития нитритрезистентных галомонад в аэробных и в аноксических условиях провели параллельную ферментацию штамма *Halomonas* sp. IB-G4 в условиях эффективной аэрации и денитрификации. Для проведения процесса использовали параметры и состав питательной среды, представленные в предыдущем разделе. Продолжительность опыта составила 28 ч. Рост культуры и аэробно, и в условиях денитрификации протекал одинаково активно (рис. 7). Только на

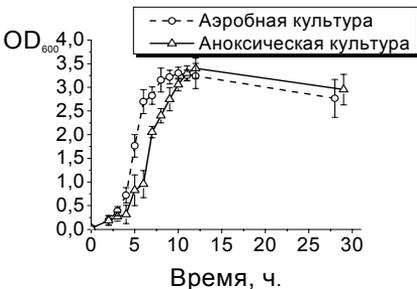


Рисунок 7. Кривые роста периодической культуры *Halomonas* sp. IB-G4 в условиях аэробного и аноксического культивирования.

и концентрации биомассы, сопоставимых с аналогичными показателями, достигаемыми при использовании методов аэробного культивирования.

Для определения максимальной удельной скорости роста (μ_{\max}) рабочего штамма в условиях аноксической ферментации провели культивирование в непрерывном режиме. При скоростях разбавления (D)

первых этапах в развитии аноксической культуры наблюдалась довольно длинная лаг-фаза, что связано с присутствием молекулярного кислорода в среде ферментера. В дальнейшем, активно образующийся в результате денитрификации азот вытеснил воздух, что обеспечило эффективный рост аноксической культуры с высокой удельной скоростью. Результаты эксперимента, выполненного без аэрации, впервые продемонстрировали возможность достижения технологических показателей аноксической ферментации, в частности, скоростей роста и

близких к критическим значениям, когда скорость вымывания клеток превышает скорость прироста, можно достичь максимальной удельной скорости роста культуры μ_{\max} . В этих условиях $D \approx \mu_{\max}$. Во время аноксического роста скорость разбавления увеличивали постепенно, вплоть до начала вымывания культуры из ферментера. На графике этот момент хорошо заметен по перелому кривой оптической плотности (рис. 8). Последнее значение D перед полным исчезновением клеток из среды, обеспечивавшее стабильное развитие культуры, соответствует максимальной удельной скорости роста штамма в данных условиях. При росте на богатой питательной среде с нитритом в качестве акцептора электронов рабочий штамм *Halomonas* sp. IB-G4 достигал $\mu_{\max} = 0,9 \text{ ч}^{-1}$ (рис. 8).



Рисунок 8. Определение максимальной удельной скорости роста рабочего штамма с NO_2^- в качестве акцептора электронов.

Изучение транспорта нитрит анионов внутрь клеток алкалофильных денитрификаторов

Принято считать, что нитрит поступает в клетки бактерий через цитоплазматическую мембрану посредством диффузии в форме протонированной азотистой кислоты (HNO_2) (Moir, Wood, 2001). Её концентрацию в среде, содержащей нитрит натрия, можно вычислить по уравнению Хендерсона-Хассельбаха (1):

$$\lg([\text{HNO}_2]) = \lg([\text{NaNO}_2]) + \text{p}K_a - \text{pH}, \quad (1)$$

где $[\text{HNO}_2]$ – концентрация протонированной азотистой кислоты, М;

$[\text{NaNO}_2]$ – концентрация нитрита натрия, М;

$\text{p}K_a = 3,3$ – константа диссоциации HNO_2 ;

pH – водородный потенциал.

Анализ этого уравнения позволяет сделать вывод о наличии обратной зависимости, связывающей концентрацию протонированной азотистой кислоты с величиной pH среды. Так для условий $\text{pH} = 6,8$ и $[\text{NaNO}_2] \approx 0,1 \text{ М}$ концентрация протонированной азотистой кислоты составит $[\text{HNO}_2] = 3,1 \times 10^{-5} \text{ М}$, а при $\text{pH} = 9,8$ и прочих равных условиях величина $[\text{HNO}_2]$ снижается на три порядка. Это позволяет, во-первых, объяснить факт активного аноксического роста алкалофильных галомонад на средах с высокими концентрациями нитритов, а, во-вторых, признать модель пассивного диффузного транспорта вполне состоятельной.

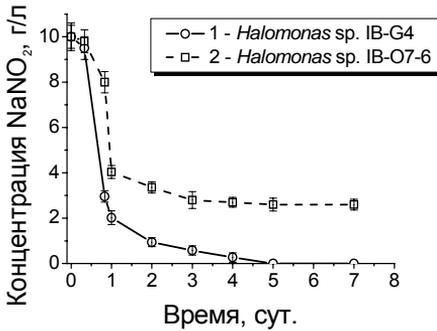


Рисунок 9. Динамика денитрификации штаммами галомонад с активным (1) и диффузионным (2) типом акцепции нитрит анионов.

Изучение динамики денитрификации у двух изолятов нашей коллекции методом ВЭКЭФ впервые позволило показать четкие различия между «классическими» денитрификаторами и культурами, активно акцептирующими нитриты (рис. 9). Развитие ряда культур сопровождалось

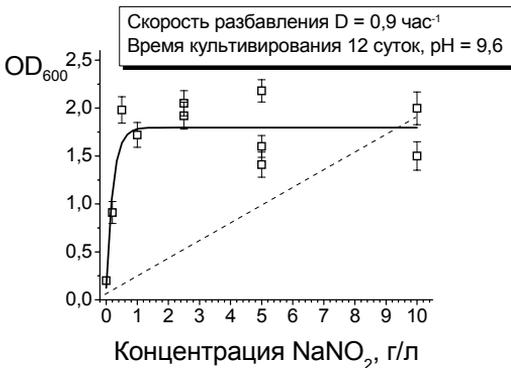


Рисунок 10. Непрерывное анаэробическое культивирование нитритофильного штамма *Halomonas* sp. IB-G4 при снижающихся концентрациях нитрита натрия.

Пунктирной линией показана возможная зависимость плотности культуральной жидкости от концентрации нитрита при диффузионном типе акцепции NO_2^- .

Вместе с тем необходимо отметить, что анаэробическое развитие многих галомонадных изолятов из нашей коллекции происходило в щелочных средах ($\text{pH} = 9,6$) и при очень низких исходных концентрациях нитрита (1,5 – 3 мМ), внесенного в качестве единственного акцептора электронов. Также нами было обнаружено практически полное исчезновение нитрит анионов из среды культивирования при росте большинства нитритрезистентных штаммов *Halomonas* в усло-

виях денитрификации, что необъяснимо с точки зрения диффузии (табл. 2). Указанные факты позволяют предположить наличие активного типа акцепции нитрит анионов некоторыми галомонадами, выявляющегося в щелочных условиях. Развитие ряда культур сопровождалось практически полным исчезновением NO_2^- из среды культивирования (штамм IB-G4 на рис. 9), в то время как часть изолятов не была способна утилизировать нитрит натрия при его концентрации ниже 2,6 г/л (штамм IB-O7-6 на рис. 9). Для изучения динамики потребления нитрита использовали питательную среду GF, содержащую нитрит натрия в концентрации 10 г/л ($\text{pH} 9,2 - 9,4$).

Дополнительным доказательством обнаруженного факта может служить культивирование штамма *Halomonas* sp. IB-G4 на установке для анаэробической ферментации в непрерывном ре-

жиме с нитритом в качестве единственного акцептора электронов (рис. 10). Культивирование вели при максимальной удельной скорости роста штамма, равной $0,9 \text{ ч}^{-1}$, с постепенным снижением концентрации нитрита натрия в питательной среде. Продолжительность непрерывного роста бактерий составила 12 суток. При этом оптическая плотность КЖ в ферментере оставалась практически неизменной независимо от содержания в среде нитрита натрия, что было бы невозможно при диффузионном типе акцепции NO_2^- . В последнем случае интенсивность роста должна была бы изменяться прямо пропорционально концентрации нитрита в питательной среде (показано пунктиром, рис. 10).

Таким образом, полученные данные на метаболическом уровне подтверждают возможность существования в клетках бактерий активного способа транслокации NO_2^- , осуществляемой, возможно, по принципу симпорта с протонами или ионами Na^+ . При этом отсутствие остаточных концентраций нитрита в среде культивирования и стабильный рост при пониженном содержании нитрита на средах с высокой щелочностью может служить четким физиологическим признаком для отделения денитрификаторов, активно акцептирующих этот анион. Учитывая потенциальную токсичность NO_2^- , бактерии, резистентные к очень высоким концентрациям нитрита и активно использующие этот анион для энергетических нужд, могут быть обозначены как нитритофильные.

Применение нитритофилов для тонкой денитрификации питьевой воды

Современная экологическая ситуация характеризуется тем, что количество водоемов и рек с водой, пригодной для питья, катастрофически уменьшается, и это утверждение, к сожалению, справедливо для регионов, богатых пресными гидроресурсами, в частности, таких, как Башкортостан. Проведенные нами анализы показали, что в зоне хозяйственной деятельности человека пресная вода не только рек, но и артезианских скважин, колодцев, родников почти всегда содержит нитраты и нитриты в концентрациях, превышающих ПДК (полученные данные не приводятся). Согласно СанПиН 2.1.4.1175-02 «Гигиенические требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана источников» предельно допустимые концентрации нитратов составляют 45 мг/л , нитритов – 3 мг/л . Существующие способы глубокой очистки воды, например, от нитритов, концентрации которых даже незначительно превышают предельно допустимые ($\sim 5\text{-}7 \text{ мг/л}$), многостадийны и довольно сложны (Shockley et al., 2007; Tartakovsky et al., 2003). Применение нитритофильных галомонад позволит значительно упростить и удешевить очистные технологии. Биохимический процесс очистки можно осуществлять одностадийно, и необходимым условием является лишь добавление

в среду требуемых количеств окисляемого субстрата. Техническим результатом процесса является удаление из загрязненной воды даже следовых количеств NO_2^- , что пока достигается лишь комплексными физико-химическими методами.

Для денитрификации образца воды из артезианской скважины, загрязненной нитрат и нитрит анионами, мы использовали штамм *Halomonas* sp. IB-I6, отличавшийся от других культур

ростом в наиболее широком диапазоне pH, отсутствием потребности в ионах Na^+ , а также обладавший активным типом акцепции нитрит анионов и нитритрезистентностью до 50 г/л NaNO_2 . Процесс вели при температуре 28 – 30°C. В качестве органического субстрата добавляли дрожжевой экстракт в количестве, адекватном содержанию нитратного и нитритного азота. О высокой эффективности денитрификации свидетельствует снижение концентрации оксианионов азота до предела детекции, определяемого чувствительностью прибора для ВЭКЭФ (рис. 11).

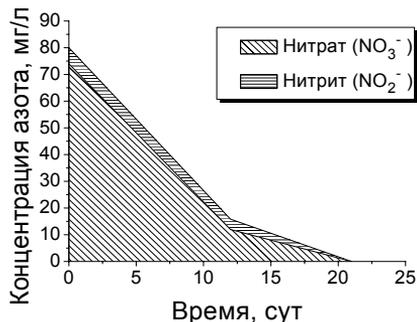


Рисунок 11. Денитрификация воды из артезианской скважины культурой *Halomonas* sp. IB-I6.

ВЫВОДЫ

1. По строению 16S рПНК выделенные нитритрезистентные денитрифицирующие *Halomonas* spp. образуют обособленную, филогенетически компактную группу, близкую к *Halomonas desiderata* со степенью гомологии 98 – 98,4%.

2. Нитритрезистентный штамм *Halomonas* sp. IB-G4 характеризуется высокой скоростью роста и денитрификации, генетической стабильностью, отсутствием патогенности и устойчивостью к контаминации и представляет собой наиболее перспективный объект для генетической модификации.

3. Впервые показана экспрессия рекомбинатного белка (GFP) в условиях неингибированного анаэробного роста на щелочной среде с 1 – 1,5% нитрита натрия с использованием в качестве хост-культуры денитрифицирующего штамма *Halomonas* sp. IB-G4, а в качестве вектора – плазмиды pHS15G2.

4. Скорость роста и концентрация биомассы в условиях периодической и непрерывной анаэробической ферментации денитрифицирующего штамма *Halomonas* sp. IB-G4 сопоставимы с аналогичными показателя-

ми, достигаемыми при использовании методов аэробного культивирования той же культуры.

5. Обнаружены два типа акцепции NO_2^- галоалкалотолерантными штаммами *Halomonas* sp., предполагающие наличие активной и пассивной систем транслокации этого токсичного аниона внутрь клетки. Нитритрезистентные денитрификаторы с активным типом акцепции нитрита обозначены как «нитритофильные».

6. Культуры *Halomonas* sp., обладающие системами активной акцепции NO_2^- , являются основой для новых перспективных технологий глубокой очистки воды от нитратов и нитритов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность к.б.н. Е.А.Гильвановой за постоянное внимание и помощь в работе. Свою искреннюю благодарность автор выражает сотрудникам Института биохимии и генетики УНЦ РАН – д.б.н., проф. А.В.Чемерису, к.б.н. Р.Р.Гарафутдинову, к.б.н. Р.Т.Матниязову; сотрудникам Института органической химии УНЦ РАН – к.х.н. С.С.Остахову, И.О.Осиной; заведующему Центральной научно-исследовательской лабораторией БГМУ, д.м.н., проф. В.В.Сперанскому за исчерпывающие консультации и методическую помощь в проведении исследований. Автор искренне благодарит всех сотрудников лаборатории прикладной микробиологии ИБ УНЦ РАН за постоянную поддержку в процессе выполнения работы. Автор искренне благодарен профессору Constantin Drinas University of Ioannina Department of Chemistry Biochemistry Lab (Греция) за любезно предоставленные образцы плазмид pRK2013, pHS15, pHS15G1 и pHS15G2.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Семёнова Е.А., Гильванова Е.А., Усанов Н.Г. Глубокая одностадийная очистка питьевой воды от нитратов и нитритов при помощи бактерий рода *Halomonas* // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2007. – №75. – С. 313 – 316.
2. Семёнова Е.А., Гильванова Е.А., Усанов Н.Г. Подбор состава питательных сред для бактерий рода *Halomonas* // Межвузовская научно-техническая конференция «Актуальные проблемы технических, естественных и гуманитарных наук», 27 – 28 апреля 2006 г., Уфа / Изд-во УГНТУ. – Уфа, 2006. – С. 357-359
3. Семёнова Е.А. Активный транспорт нитрита у некоторых штаммов *Halomonas* // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2007»; секция «Биология»; 11 – 14 апреля 2007 г., Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет. – М.: МАКС Пресс, 2007. – С. 117 – 118.

4. Семёнова Е.А Новые принципы ферментации микроорганизмов // БИОМИКА – НАУКА XXI ВЕКА; Материалы школы-семинара; Уфа, 9 – 15 сентября 2007 г.–Уфа, 2007.– С. 118 – 120.
5. Семёнова Е.А., Гильванова Е.А. Алкалофильные нитритофилы группы *Halomonas* // Современные проблемы экологии, микробиологии и иммунологии: Материалы региональной конференции молодых ученых с международным участием, 29 ноября – 1 декабря 2007 г., Екатеринбург – Пермь / Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН.– Пермь, 2007.– С. 101 – 103.
6. Семёнова Е.А. Новая парадигма ферментации // Материалы II Международной Школы молодых ученых «Эмбриология, генетика и биотехнология», Уфа, 3 – 7 декабря 2007 г.– Уфа: Изд-во БПИУ, 2007.– С. 107 – 108.
7. Семёнова Е.А., Гильванова Е.А., Усанов Н.Г. Экологическое состояние подземных вод в условиях антропогенного загрязнения: проблемы и перспективы микробиологической очистки от нитратов и нитритов // материалы Междунар. науч. конф. «Проблемы биоэкологии и пути их решения (Вторые Ржавитинские чтения)», Саранск, 15 – 18 мая 2008 г.– Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2008.– С. 423 – 425.
8. Gilvanova E.A., Semenova E.A., Usanov N.G. *Halomonas sp.* partial 16S rRNA gene, strain IB-G4 // EMBL Nucleotide Sequence Database.– 2007. – Accession number AM490139.
9. Gilvanova E.A., Semenova E.A., Usanov N.G. *Halomonas sp.* partial 16S rRNA gene, strain IB-O7-1 // EMBL Nucleotide Sequence Database.– 2007.– Accession number AM490137.
10. Gilvanova E.A., Semenova E.A., Usanov N.G. *Halomonas sp.* partial 16S rRNA gene, strain IB-O7-6 // EMBL Nucleotide Sequence Database.– 2007.– Accession number AM490138.
11. Gilvanova E.A., Semenova E.A., Usanov N.G. *Halomonas sp.* partial 16S rRNA gene, strain IB-O18 // EMBL Nucleotide Sequence Database.– 2007.– Accession number AM490136.
12. Gilvanova E.A., Semenova E.A., Usanov N.G. *Halomonas sp.* partial 16S rRNA gene, strain IB-NN3-2c // EMBL Nucleotide Sequence Database.– 2007.– Accession number AM490135.