

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛКАЛОТОЛЕРАНТНЫХ БАКТЕРИЙ С ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ИЗ СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА

© 2021 г. А. В. Шилова<sup>а, \*</sup>, А. Ю. Максимов<sup>а, b</sup>, Ю. Г. Максимова<sup>а, b</sup>

<sup>а</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального  
исследовательского центра УрО РАН, Пермь, 614081 Россия

<sup>б</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614990 Россия

\*e-mail: A.Shilova-IEGM@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.07.2020 г.

После доработки 31.08.2020 г.

Принята к публикации 09.11.2020 г.

Идентифицировано 58 культур алкалолотолерантных бактерий, обладающих амилазной, липазной, протеазной и целлюлазной активностями, которые были выделены из содового шламоохранилища на среде с селективными субстратами в отсутствие экстремальных условий (рН 8) и на богатой среде с рН 11 без селективных субстратов. Исследовано влияние рН и концентрации хлорида натрия на рост и проявление гидролитической активности у штаммов *Pseudomonas peli*, *Paenarthrobacter nitroquajacolicus* и *Microbacterium kitamiense*, обладающих липазной и амилазной активностями. Показано, что амилазы культур, выделенных на среде с рН 11 и 8, проявляют наибольшую активность при рН 10 и 6 соответственно, тогда как удельная активность внеклеточной липазы изолятов *P. peli*, выделенных при рН 8, максимальна при рН 11. На среде с рН 11 выделены *Bacillus aequororis*, *Brevibacterium ptyocampae*, *Microbacterium kitamiense*, *Microcella putealis*, *Oerskovia paurometabola*, *O. enterophila*, *O. jenensis*, обладающие активностью щелочной амилазы.

**Ключевые слова:** содовое озеро, содовое шламоохранилище, алкалофилы, алкалолотолерантные микроорганизмы, гидролитическая активность, амилаза, липаза, протеаза, целлюлаза

DOI: 10.31857/S0026365621020130

Места обитания, значительно отличающиеся по одному или нескольким физико-химическим параметрам от большинства экосистем, принято называть экстремальными, а населяющие их организмы – экстремофилами. Экстремальные водные системы широко распространены в природе и отличаются крайними значениями температуры, рН, солености, повышенным давлением, высокими концентрациями токсичных веществ (Horikoshi, 1999; Grant, Sorokin, 2011). Длительное время экстремофилы находятся в центре внимания исследователей. Большой интерес вызывает изучение механизмов биохимической адаптации микроорганизмов к экстремальным условиям окружающей среды, а также использование их биомассы и экстремоферментов в биотехнологии (Морозкина и соавт., 2010).

Содовые озера – экстремальные природные водные системы, характерной особенностью которых является высокая концентрация солей и щелочная среда. Накопление соды происходит вследствие их питания поверхностными и грунтовыми карбонатными водами, минерализован-

ными за счет выветривания силикатов (Заварзин, Жилина, 2000; Борзенко, Замана, 2008; Sorokin et al., 2015). Щелочные высокоминерализованные водные системы могут иметь и антропогенное происхождение. Это могут быть шламонакопители, места захоронения отходов, щелочные сточные воды. Работы, посвященные изучению микробиома таких искусственных щелочных биоценозов, немногочисленны (Kevbrin, 2019). Так, изучено микробное разнообразие и геохимия озера Калумет на юго-востоке Чикаго. За десятилетия захоронения промышленных отходов крупномасштабное заполнение заболоченных угодий стальным шлаком создало водоносный горизонт со значениями рН, достигающими 12.8. В этой щелочной среде были обнаружены представители *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* и *Firmicutes* (Roadcap et al., 2006). Из золя щелочного диоксида кремния, который является важным малотоннажным химическим продуктом, были выделены штаммы факультативных алкалофилов с протеазной и амилазной активностями (Ren et al., 2014). Щелочные сточные воды также явились источником выделения алкалофиль-

ных бактерий, которые были отнесены к родам *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Cupriavidus*, *Escherichia*, *Mari-nococcus*, *Micrococcus*, *Natronobacterium*, *Neisseria*, *Pleisomonas*, *Pseudomonas* и *Sporosarcina* (Ali et al., 2009). Есть единичный пример исследования микробиома содового шламоохранилища. Было изучено микробное разнообразие искусственной щелочной среды – отходов производства карбоната натрия, получаемого из известняка и хлорида натрия по методу Сольве в Польше, г. Яниково. В этой сильно засоленной, щелочной и бедной питательными веществами среде было обнаружено бактериальное сообщество, в котором доминировали филумы *Proteobacteria* (52.8%) и *Firmicutes* (16.6%) (Kalwasińska et al., 2017).

Нами ранее был изучен микробиом шламоохранилища АО “Березниковский содовый завод” (Пермский край), на котором кальцинированная сода также производится аммиачным способом по методу Сольве (Шилова и соавт., 2018, 2020). Это техногенное образование характеризуется щелочной реакцией среды (рН до 12) и высокой степенью минерализации за счет содержания катионов натрия, калия и аммония, а также хлорид- и сульфат-анионов. В процессе извлечения аммиака образуется хлорид кальция, который составляет большую часть отходов производства. В шламонакопитель отход поступает в виде пульпы, в которой преобладает жидкая фаза (Блинов и соавт., 2003), что отличает его от содового шламоохранилища г. Яниково, где эти отходы представляют собой относительно сухую массу (Kalwasińska et al., 2017).

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 в щелочных условиях и при высоких концентрациях соли (Морозкина и соавт., 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, составив около 25% объема используемых промышленными ферментов. Щелочные амилазы сохраняют активность в диапазоне рН 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). Щелочные целлюлазы также 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 в щелочной среде, в основном находят применение в производстве моющих средств (Hasan et al., 2010).

В связи с этим, целью работы было выделение из содового шламоохранилища гидролитических алкалофильных и алкалотолерантных бактерий, их идентификация, а также изучение влияния рН и концентрации хлорида натрия на рост, липазную и амилазную активность наиболее перспективных штаммов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлось содовое шламоохранилище АО “Березниковский содовый завод”, расположенное на северо-западной окраине г. Березники Пермского края (59.439618 с.ш., 56.715197 в.д. – 59.427038 с.ш., 56.746573 в.д.). Пробы воды и донных отложений, а также техногенных поверхностных образований в прибрежной зоне действующего и грунта осушенного шламоохранилища отбирали в сентябре 2017 г. В почвоподобных образованиях осушенного шламоохранилища пробы отбирали с поверхности, а также с глубины 5 и 10 см (в точке 59.428803 с.ш., 56.729718 в.д.). Образцы хранили при температуре 4°C.

Выделение алкалофильных и алкалотолерантных бактерий проводили в двух вариантах:

1) Высев на слабощелочной среде с селективными субстратами (рН 8), создающий условия для преимущественного роста гидролитически-активных бактерий с протеазной, амилазной, целлюлазной и липазной активностями. Пробы высевали на агаризованную среду Пфеннига следующего состава (г/л):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 0.3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0.3,  $\text{MgCl}_2$  – 0.3,  $\text{CaCl}_2$  – 0.03, дрожжевой экстракт – 0.5, раствор микроэлементов по Липперту–Витману – 1 мл (Рандагуруева, Лаврентьева, 2009). В качестве субстратов вносили до концентрации 1.5%: пептон (“Sigma–Aldrich”) для выделения протеолитиков, крахмал растворимый (ЗАО “ННПЦ ГИП”, Оболенск, Россия) – для амилолитиков, микрокристаллическую целлюлозу ЛТ

(“Chemapol”, Чехословакия) – для целлюлолитиков, твин-80 (“FERAK”, Германия) – для липолитиков. Кислотность среды доводили 1 М раствором NaOH до 8 и инкубировали чашки при 30°C.

2) Высев на богатой среде с рН 11 без селективных субстратов, позволяющий выделить культуры, устойчивые к экстремальному защелачиванию среды. Для этого использовали богатую среду следующего состава (г/л): пептон – 10, глюкоза – 10, дрожжевой экстракт – 5,  $K_2HPO_4$  – 1,  $Na_2CO_3$  – 10, рН 11 (Atlas, 1993).

Идентификацию изолятов до вида 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'. Температурный цикл состоял из начальной денатурации при 95°C в течение 3 мин, 35 циклов амплификации (денатурация при 94°C в течение 30 с, отжиг при 54°C в течение 30 с и элонгация при 72°C в течение 60 с) и окончательно элонгация при 72°C в течение 3 мин. ПЦР-ампликоны анализировали электрофоретически в 1% агарозном геле в *tris*-боратном буфере при напряженности поля 5 В/см. Для оценки молекулярной массы фрагментов ДНК использовали маркеры 1 kb (ООО “СибЭнзим”, Новосибирск). Визуализацию полос осуществляли путем окрашивания бромистым этидием с последующим документированием с использованием системы гельдокументации BioDocAnalyze (“Biometra”, Германия). Очистку ПЦР-продукта перед секвенированием осуществляли с использованием смеси ферментов ExoSAPMix (“Thermo Fisher Scientific”, США). Секвенирующую реакцию проводили с праймером 27F и набором Big Dye Terminator v. 3.1 (“Thermo Fisher Scientific”, США), в соответствии с инструкцией производителя. Анализ проводили на приборе Genetic Analyzer 3500xl (“Applied Biosystems”, США). Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК проводили с использованием онлайн-сервиса EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>).

Для определения липолитической активности изолятов, выращенных на селективной среде с твин-80, проводили биохимическую реакцию с *p*-нитрофениллауратом, который под действием липазы расщеплялся с образованием окрашенного продукта *p*-нитрофенола (Margesin et al., 2002). Активность липазы определяли по приросту оптической плотности среды при  $\lambda$  405 нм, измеренной на спектрофотометре Ultraspec 3000 (“GE Healthcare”, США).

Активность амилазы оценивали с помощью коммерческого набора реактивов для определения

амилазы Альфа-Амилаза-Ольвекс (ООО “Ольвекс Диагностикум”, Россия). Реакция основана на гидролизе синтетического субстрата этилиден-*p*-нитрофенилмальтогептазида с образованием нитрофенилмальтозидов, которые подвергаются дальнейшему расщеплению  $\alpha$ -глюкозидазой до глюкозы и окрашенного продукта *p*-нитрофенола. Активность фермента определяли по изменению оптической плотности среды при  $\lambda$  405 нм на планшетном ридере Infinite M1000 (“Tecan”, Швейцария) в течение пяти циклов с интервалом в 1 мин.

Измерение целлюлолитической 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 Infinity M1000 (“Tecan”, Швейцария) в течение пяти циклов с интервалом в 1 мин при  $\lambda$  500 нм. Для качественного определения целлюлолитической активности использовали способность красителя конго красного образовывать комплекс с целлюлозой. Культуры высевали штрихом на чашки с минимальной средой следующего состава (г/л):  $KH_2PO_4$  – 1.0,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  – 3.7, NaCl – 0.5, раствор микроэлементов по Липперту–Витману – 1 мл и КМЦ в качестве субстрата и инкубировали в термостате при 30°C, после чего окрашивали среду 1% конго красным, выдерживали 15 мин и смывали 1 М раствором NaCl. Целлюлолитическую активность оценивали по зоне просветления вокруг штриха.

Протеазную активность оценивали по ширине зоны лизиса казеината натрия (“Sigma–Aldrich”, Германия) вокруг штриха.

Для оценки влияния концентрации хлорида натрия и рН на рост и активность наиболее перспективных изолятов варьировали рН среды Пфеннига, содержащей соответствующий источник углерода, в диапазоне от 6 до 11. Добавляли NaCl до концентрации 0.5, 5, 50, 100, 200 г/л; 4 мл среды инокулировали 50 мкл культуры ( $OP_{540} = 1.0$ ). О росте бактерий судили по увеличению биомассы (мг/мл), которую определяли гравиметрически. Для этого центрифугировали суспензию клеток, полученный осадок высушивали до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 50°C и взвешивали на аналитических весах. Выживаемость бактерий оценивали методом КОЕ при высевах из десятикратных разведений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Идентификация изолятов.** Несмотря на то, что щелочные высокоминерализованные среды антропогенного происхождения бедны питательными субстратами, скрининг образцов грунта, осадков и воды содового шламохранилища г. Березники на наличие бактериальных культур с активностью амилазы, липазы, протеазы и целлюлазы позволил выделить и идентифицировать культуры алкало-толерантных умеренно галофильных гидролитических бактерий (табл. 1, 2). Как отмечено ранее, 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.

Таким образом, проведенные исследования в содовом шламохранилище г. Березники позволили выделить и идентифицировать гидролитические бактерии филумов *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria*.

В условиях умеренно-щелочной среды выделены алкало-толерантные микроорганизмы. Среди культур, 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 класса *Bacilli* (*Firmicutes*). На среде с крахмалом наблюдалось большее таксономическое разнообразие изолятов: были выделены культуры *Sphingopyxis panaciterrae* и *Ensifer morelensis*, относящиеся к классу *Alphaproteobacteria*; *Pseudomonas peli* (*Gammaproteobacteria*); *Microcella putealis* и *Arthrobacter ginsengisoli* (*Actinobacteria*); *Bacillus cereus* (*Firmicutes*, *Bacilli*) и *Pedobacter quisquiliarum* (*Bacteroidetes*, *Sphingobacteriia*).

На среде с целлюлозой, являющейся наиболее сложно метаболизируемым субстратом из используемых, выделены культуры *Lysobacter prati* (*Gammaproteobacteria*); *Paenarthrobacter aureus* (*Actinobacteria*, порядок *Micrococcales*); *Metabacillus indicus* (*Firmicutes*, класс *Bacilli*).

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

При выделении на богатой среде при рН 11 не обнаружено существенных отличий по составу высеваемых микроорганизмов между материалом действующей и старой карты шламонакопителя.

Большую часть изолятов составляли представители актинобактерий. В том числе выделены виды рода *Oerskovia* (*Actinobacteria*; *Micrococcales*), а также бациллы *B. aequororis*, *B. halmapalus*, *B. zhangzhouensis*, которые не выделялись на средах с более низким рН и являются алкалофилами.

У чистых культур, выделенных на твин-80, целлюлозе, пептоне и крахмале в качестве источника углерода, определяли соответствующую гидролитическую активность. Также проводили скрининг на наличие гидролитических активностей у культур, выделенных на богатой среде с рН 11.

**Целлюлазная активность изолятов.** Изученные образцы характеризовались высоким содержанием целлюлозолитических бактерий. Их максимальная численность была отмечена в грунте старого содового озера (рН 8), отобранном с глубины 5 см –  $1.27 \times 10^9$  КОЕ/г. Образцы грунта прибрежной зоны действующего шламохранилища (рН 8), содержащие ризосферу растений, также характеризовались высоким количеством микроорганизмов, утилизирующих полисахариды (до  $8.4 \times 10^8$  КОЕ/г). Очевидно, что их обилие связано с наличием в среде полисахаридов растительного происхождения.

На агаризованной среде Пффеннига с целлюлозой как источником углерода было выделено 11 изолятов. Первоначально проводили качественную оценку целлюлазной активности выделенных культур. Максимальная зона лизиса отмечена у изолятов 11-Ц (9 мм) и 6-Ц (10 мм). В результате секвенирования генов 16S рПНК штамм 11-Ц идентифицирован как *Microbacterium pygmaeum*, а штамм 6-Ц как *Paenarthrobacter aureus* (табл. 1).

Был проведен скрининг изолятов, выделенных на щелочной среде с рН 11, на наличие целлюлозолитической активности. Максимальная активность целлюлазы (размер зоны просветления 8 мм) была обнаружена у изолята 13-ДБ, идентифицированного как *Oerskovia enterophila* (табл. 2). Значительная зона лизиса (6 мм) была отмечена у изолятов 3-ДБ и 10-ДБ, идентифицированных как *O. paurometabola* и *O. jenensis* соответственно.

Определяли активность целлюлазы в клеточной биомассе и в культуральной жидкости наиболее активных изолятов (табл. 3). В супернатанте максимальная целлюлозолитическая активность (0.49 ммоль/(л сут)) выявлена у изолята 11-Ц. Целлюлазная активность, достигающая 0.47 ммоль/(л сут), также была отмечена у образцов, выделенных из грунта старой карты содового шламохранилища. Максимальная активность целлюлазы (0.17 ммоль/(л сут)), ассоциированной с клеточной биомассой, была выявлена у изолята 8-Ц, идентифицированного как *Metabacillus indicus*.

**Амилазная активность изолятов.** При скрининге изолятов, выделенных на среде с крахмалом как единственным источником углерода, у всех

**Таблица 1.** Идентификация изолятов гидролитических бактерий, выделенных на крахмале, пептоне, твин-80 и целлюлозе в качестве единственного источника углерода

Изолят	Субстрат	Типовой штамм ближайшего родственного вида и номер в базе данных EzBioCloud	Сходство генов 16S рРНК, %	Количество прочтенных нуклеотидов	Идентификационный номер последовательности в GenBank
Старая карта содового шламонакопителя					
8-К	Крахмал	<i>Sphingopyxis panaciterrae</i> , Gsoil124 <sup>T</sup> AB245353	99.23	783	MT860696
9-К		<i>Pedobacter quisquiliarum</i> , C62-2 <sup>T</sup> KU973598	99.75	808	MT860697
14-К		<i>Pseudomonas peli</i> , R-20805 <sup>T</sup> AM114534	99.65	851	MT860695
15-К		<i>Pseudomonas peli</i> , R-20805 <sup>T</sup> AM114534	99.65	851	MT887618
21-К		<i>Microcella putealis</i> , CV-2 <sup>T</sup> AJ717388	100	726	MT860698
24-К		<i>Bacillus cereus</i> , ATCC14579 <sup>T</sup> AE016877	100	879	MT860699
26-К		<i>Ensifer morelensis</i> , Lc04 <sup>T</sup> AY024335	99.88	872	MT860700
29-К		<i>Arthrobacter ginsengisoli</i> , DCY81 <sup>T</sup> KF212463	99.75	797	MT860701
1-Ц	Целлюлоза	<i>Lysobacter prati</i> , SYSU H10001 <sup>T</sup> MN181427	99.71	802	MT875267
6-Ц		<i>Paenarthrobacter aurescens</i> , NBRC 12136 <sup>T</sup> BJMD01000050	99.36	594	MT875275
8-Ц		<i>Metabacillus indicus</i> , LMG 22858 <sup>T</sup> JGVU01000003	100	693	MT875282
3-Т	Твин-80	<i>Pseudomonas peli</i> , R-20805 <sup>T</sup> AM114534	99.17	855	MT860703
4-Т		<i>Sphingopyxis chilensis</i> , S37 <sup>T</sup> AF367204	99.47	1321	MT860704
5-Т		<i>Bosea lathyri</i> , DSM 26656 <sup>T</sup> jgi.1058926	99.75	809	MT860706
6-Т		<i>Ensifer morelensis</i> , Lc04 <sup>T</sup> AY024335	99.62	795	MT860707
10-Т		<i>Exiguobacterium undae</i> , DSM 14481 <sup>T</sup> JHZV01000003	100	842	MT860708
11-Т		<i>Ensifer morelensis</i> , Lc04 <sup>T</sup> AY024335	99.76	1264	MT860709
13-Т		<i>Ensifer morelensis</i> , Lc04 <sup>T</sup> AY024335	99.63	810	MT860710
14-Т		<i>Pseudomonas peli</i> , R-20805 <sup>T</sup> AM114534	99.17	855	MT887617
15-Т		<i>Pseudomonas peli</i> , R-20805 <sup>T</sup> AM114534	100	885	MT860712
16-Т		<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> , AMX 26B <sup>T</sup> AF273082	99.88	843	MT860715
17-Т	<i>Pseudoxanthomonas putridarboris</i> , WD12 <sup>T</sup> GU908487	98.82	847	MT860720	
5-П	Пептон	<i>Exiguobacterium undae</i> , DSM14481 <sup>T</sup> JHZV01000003	100	729	MT872007
7-П		<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> , AMX 26B <sup>T</sup> AF273082	99.88	841	MT872010
12-П		<i>Bacillus aquimaris</i> , TF-12 <sup>T</sup> AF483625	99.27	829	MT875305
14-П		<i>Paenarthrobacter aurescens</i> , NBRC 12136 <sup>T</sup> BJMD01000050	92.42	729	MT872020
15-П		<i>Ensifer morelensis</i> , Lc04 <sup>T</sup> AY024335	100	876	MT872021

Таблица 1. Окончание

Изолят	Субстрат	Типовой штамм ближайшего родственного вида и номер в базе данных EzBioCloud	Сходство генов 16S рРНК, %	Количество прочтенных нуклеотидов	Идентификационный номер последовательности в GenBank
Действующее содовое шламоохранилище					
4-К	Крахмал	<i>Paenisporosarcina quisquiliarum</i> , SK 55 <sup>T</sup> DQ333897	99.29	841	MT872022
5-К		<i>Microcella putealis</i> , CV-2 <sup>T</sup> AJ717388	100	910	MT872023
6-К		<i>Actinotalea fermentans</i> , DSM 3133 <sup>T</sup> AXСХ01000029	98.86	875	MT872026
7-К		<i>Microcella putealis</i> , CV-2 <sup>T</sup> AJ717388	100	831	MT872027
10-К		<i>Microbacterium oxydans</i> , DSM 20578 <sup>T</sup> Y17227	100	790	MT872028
13-К		<i>Pseudomonas peli</i> , R-20805 <sup>T</sup> AM114534	99.40	671	MT872055
19-К		<i>Bacillus vietnamensis</i> , 15-1 <sup>T</sup> AB099708	99.54	879	MT872057
25-К		<i>Bacillus aquimaris</i> , TF-12 <sup>T</sup> AF483625	98.69	768	MT872059
27-К		<i>Paenarthrobacter nitroquajacolicus</i> , G2-1 <sup>T</sup> AJ512504	100	876	MT872058
28-К		<i>Bacillus toyonensis</i> , BCT-7112 <sup>T</sup> CP006863	100	867	MT875308
11-Ц	Целлюлоза	<i>Microbacterium pygmaeum</i> , DSM 23142 <sup>T</sup> LT6296692	99.76	821	MT872064
8-Т	Твин-80	<i>Bacillus aquimaris</i> TF-12 <sup>T</sup> AF483625	99.88	814	MT875310
9-Т		<i>Metabacillus litoralis</i> , SW-211 <sup>T</sup> AY608605	100	799	MT875314
12-Т		<i>Citricoccus zhacaiensis</i> , FS24 <sup>T</sup> EU305672	99.17	844	MT872066
1-П	Пептон	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , DSM 7 <sup>T</sup> FN597644	99.78	903	MT872067
2-П		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , DSM 7 <sup>T</sup> FN597644	100	838	MT872068
3-П		<i>Dietzia maris</i> , DSM 43672 <sup>T</sup> X79290	100	719	MT872069
6-П		<i>Kocuria polaris</i> , CMS 76or <sup>T</sup> JSUH01000031	99.76	835	MT872071
8-П		<i>Microcella putealis</i> , CV-2 <sup>T</sup> AJ717388	100	858	MT872070
9-П		<i>Arthrobacter halodurans</i> , JSM078085 <sup>T</sup> EU583729	99.86	727	MT872072
11-П		<i>Micrococcus luteus</i> , NCTC 2665 <sup>T</sup> CP001628	100	788	MT875311

изученных образцов была определена амилолитическая активность. Численность микроорганизмов, утилизирующих крахмал, была максимальна в образцах грунта старой карты содового шламоохранилища с глубины 5 см (рН 8) и достигала  $3.31 \times 10^9$  КОЕ/г. Также значительное количество бактерий отмечено в образцах ризосферы растений из грунта прибрежной части действующего шламоохранилища (рН 8).

Наибольшая активность амилазы была отмечена в образцах культуральной жидкости

(табл. 4). Максимальная активность, равная 30.32 мкмоль/(л мин), определена у изолята *Ensifer morelensis* 26-К. Наибольшая амилолитическая активность (20.03 мкмоль/(л мин)), ассоциированная с клетками, установлена у культуры *Paenisporosarcina quisquiliarum*.

Высокую амилазную активность, как внеклеточную (14.7 мкмоль/(л мин)), так и ассоциированную с клетками (8.65 мкмоль/(л мин)), проявил штамм *Paenarthrobacter nitroquajacolicus*. Рост данного изолята наблюдали при рН 6–10 и 0.5–50 г/л NaCl.

**Таблица 2.** Идентификация изолятов гидролитических бактерий, выделенных на богатой среде с рН 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
Старая карта содового шламонакопителя				
3-ДБ	<i>Oerskovia paurometabola</i> , DSM14281 <sup>T</sup> AJ314821	99.86	748	MT872073
4-ДБ	<i>Brevibacterium pityocampae</i> , DSM21720 <sup>T</sup> EU484189	100	754	MT872074
5-ДБ	<i>Bacillus aequororis</i> , M-8 <sup>T</sup> KC686697	99.87	758	MT875306
12-ДБ	<i>Bacillus aequororis</i> , M-8 <sup>T</sup> KC686697	99.76	833	MT875307
13-ДБ	<i>Oerskovia enterophila</i> , DSM 43852 <sup>T</sup> MAQA01000098	100	845	MT872075
Действующее содовое шламохранилище				
7-ДБ	<i>Bacillus halmapalus</i> , DSM 8723 <sup>T</sup> KV917375	99.75	813	MT872080
8-ДБ	<i>Bacillus zhangzhouensis</i> , DW5-4 <sup>T</sup> JOTP01000061	98.73	709	MT872079
9-ДБ	<i>Microcella putealis</i> , CV-2 <sup>T</sup> AJ717388	100	825	MT872081
10-ДБ	<i>Oerskovia jenensis</i> , DSM46000 <sup>T</sup> AJ314848	100	697	MT872082
16-ДБ	<i>Microbacterium kitamiense</i> , Kitami C2 <sup>T</sup> AB013919	100	802	MT872083

**Таблица 3.** Целлюлозолитическая активность культуральной жидкости и биомассы штаммов, выделенных на селективной среде с целлюлозой

Изолят	Организм	Целлюлозолитическая активность	
		супернатант, ммоль/(л сут)/биомасса, мг/мл	биомасса, ммоль/(мг сут)
1-Ц	<i>Lysobacter prati</i>	0.47/6.7	0.17
6-Ц	<i>Paenarthrobacter aureescens</i>	0.41/8.9	0.10
8-Ц	<i>Metabacillus indicus</i>	0.41/7.3	0.17
11-Ц	<i>Microbacterium pygmaeum</i>	0.49/13.8	0.07

Максимальное количество жизнеспособных клеток содержала культура, выращенная с 5 г/л NaCl в среде при рН 10. Наибольшая активность амилазы отмечена при рН 6 и 50 г/л NaCl. Данный изолят может быть отнесен к экстремотолерантным микроорганизмам, т.к. была показана его способность к росту на среде с высокими рН и концентрацией соли, но оптимум роста был приближен к нормальным физиологическим условиям.

Изоляты, выделенные на щелочной среде (рН 11), также были исследованы на амилитическую активность (табл. 5). Максимальная активность внеклеточной амилазы, отмеченная у изолята 16-ДБ, идентифицированного как *Microbacterium kitamiense*, при рН 8 достигала 23.15 ммоль/(л мин). Диапазон роста данного изолята находился в пределах рН 7–11 и 0.5–100 г/л NaCl. Максимальное

количество жизнеспособных клеток и наибольшая активность амилазы (48.21 ммоль/(л мин)) отмечены в культуре, выращенной при 5 г/л NaCl и рН 10.

Культуры *Bacillus aequororis* и *Oerskovia jenensis* проявили высокую активность амилазы, ассоциированной с клетками, которая достигала 11.8 ммоль/(мг мин).

**Липазная активность изолятов.** У бактериальных культур, выделенных на среде с твин-80, исследована липолитическая активность культуральной жидкости и биомассы (табл. 6). Из всех изученных образцов шламохранилища выделены изоляты, обладающие липолитической активностью. Максимальная численность микроорганизмов, достигающая  $5.7 \times 10^9$  КОЕ/г, установлена в образцах техногенных поверхностных образова-

**Таблица 4.** Амилолитическая активность культуральной жидкости и биомассы штаммов, выделенных на селективной среде с крахмалом

Изолят	Организм	Амилолитическая активность	
		супернатант, мкмоль/(л мин)/биомасса, мг/мл	биомасса, мкмоль/(мг мин)
3-К	<i>Ensifer morelensis</i>	14.71/5.4	4.33
4-К	<i>Paenisporsarcina quisquiliarum</i>	14.83/3.7	20.03
5-К	<i>Micricella putealis</i>	11.76/3.9	14.36
6-К	<i>Actinotalea fermentans</i>	10.98/10.3	4.51
7-К	<i>Micricella putealis</i>	11.05/4.7	15.94
8-К	<i>Sphingopyxis panaciterrae</i>	16.10/6.1	4.40
9-К	<i>Pedobacter quisquiliarum</i>	17.38/5.2	12.19
10-К	<i>Arthrobacter agilis</i>	16.11/5.8	2.36
13-К	<i>Pseudomonas peli</i>	10.05/4.5	9.96
14-К	<i>Pseudomonas peli</i>	10.21/5.1	11.88
19-К	<i>Bacillus vietnamensis</i>	10.77/7.5	3.93
21-К	<i>Micricella putealis</i>	13.19/7.5	3.06
24-К	<i>Bacillus cereus</i>	10.58/10.8	2.21
25-К	<i>Bacillus aquimaris</i>	10.37/7.1	4.91
26-К	<i>Ensifer morelensis</i>	30.32/7.6	11.81
27-К	<i>Paenarthrobacter nitroquajacolicus</i>	14.71/3.7	8.65
28-К	<i>Bacillus toyonensis</i>	10.23/10.6	11.34
29-К	<i>Arthrobacter ginsengisoli</i>	14.91/7.1	10.55

**Таблица 5.** 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)
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
10-ДБ	<i>Oerskovia jenensis</i>	20.05/6.7	11.11	1.16/5.7	1.68
12-ДБ	<i>Bacillus aequororis</i>	19.56/6.9	7.93	1.09/4.3	1.97
13-ДБ	<i>Oerskovia enterophila</i>	18.92/8.4	7.23	1.44/8.0	0.88
16-ДБ	<i>Microbacterium kitamiense</i>	23.15/12.1	3.95	1.46/3.6	2.62

ний прибрежной зоны действующего шламохранилища. Отмечена липазная активность в культуральной жидкости 6-ти изолятов. Наибольшую активность проявил изолят, идентифицированный как *Pseudomonas peli*. Активность липазы, связанной с клетками, проявили 17 бактериальных культур. Высокая липолитическая активность отмечена у

штаммов *P. peli*, а также *Pseudoxanthomonas mexicana* и *Pseudoxanthomonas putridarboris*.

Изучено влияние pH и концентрации NaCl на рост наиболее перспективного изолята *P. peli*, проявившего активность внеклеточной и ассоциированной с клетками липазы. Было выявлено, что изолят был способен к росту при pH 7–10 и



**Таблица 6.** Липолитическая активность культуральной жидкости и биомассы штаммов, выделенных на селективной среде с твин-80

Изолят	Организм	Липолитическая активность	
		супернатант, мкмоль/(л мин)/биомасса, мг/мл	биомасса, мкмоль/(мг мин)
3-Т	<i>Pseudomonas peli</i>	0.83/1.9	2.97
4-Т	<i>Sphingopyxis chelensis</i>	—	0.19
5-Т	<i>Bosea lathyri</i>	—	0.18
8-Т	<i>Bacillus aquimaris</i>	—	0.12
9-Т	<i>Metabacillus litoralis</i>	—	0.13
10-Т	<i>Exiguobacterium undae</i>	—	0.14
11-Т	<i>Ensifer morelensis</i>	—	0.18
12-Т	<i>Citricoccus zhacaieasis</i>	—	0.18
13-Т	<i>Ensifer morelensis</i>	0.34/3.4	0.33
14-Т	<i>Pseudomonas peli</i>	0.78/4.5	1.36
15-Т	<i>Pseudomonas peli</i>	0.74/3.2	2.24
16-Т	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	0.25/2.3	0.54
17-Т	<i>Pseudoxanthomonas putridae</i>	—	0.41

0.5–50 г/л NaCl. Максимальное количество жизнеспособных микроорганизмов ( $1.2 \times 10^6$  КОЕ/г) содержала культура, выращенная на среде с 5 г/л NaCl и рН 7. Таким образом, выделенный штамм является алкалотолерантным и галотолерантным. Активность внеклеточной липазы возрастала с увеличением концентрации хлорида натрия и рН. Максимальная активность (12.59 мкмоль/(лмин)) отмечена при 100 г/л NaCl и рН 11. Наименьшую активность внеклеточный фермент проявил при рН 6.

Скрининг изолятов, выделенных на среде с пептоном, глюкозой и дрожжевым экстрактом (рН 11), показал, что все культуры обладают липолитической активностью (табл. 5). Штамм 16-ДБ, идентифицированный как *Microbacterium kitamiense*, обладал наибольшей активностью липазы, ассоциированной как с биомассой клеток (2.62 мкмоль/(мг мин)), так и с супернатантом (1.46 мкмоль/(л мин)). Как было отмечено выше, данный штамм также проявил максимальную амилолитическую активность.

**Протеазная активность изолятов.** Для выявления протеолитической активности бактерии высевали штрихом на агаризованную среду с казеинатом натрия и оценивали результаты, измеряя зону просветления, которая образуется при расщеплении казеина. Зона лизиса от края штриха для разных изолятов составляла от 1 до 12 мм. При скрининге изолятов, ранее выделенных на среде с пептоном, у всех изученных образцов была определена протеолитическая активность. Наибольшая активность (зона лизиса 12 мм) отмечена у изолята *Arthrobacter halodurans*. Также протеазную активность выявили у культур *Micrococcus luteus* (10 мм),

*Bacillus amyloliquefaciens* (9 мм) и *Microcella putealis* (7 мм).

Культуры, выделенные и выращенные при рН 11, были исследованы на протеолитическую активность. Наибольшая активность протеазы (зона просветления 15 мм) установлена у *Bacillus halmapalus*, выделенного из грунта прибрежной части действующего шламохранилища. Изолят *Oerskovia jenensis* из грунта старого содового озера с глубины 5 см проявил высокую протеолитическую активность (зона просветления 10 мм). Данный изолят также характеризуется высокой активностью целлюлазы.

Таким образом, из образцов грунта, осадков и воды содового шламохранилища г. Березники на среде с селективными субстратами при рН 8 и на богатой среде с рН 11 выделены культуры алкалотолерантных и алкалофильных умеренно галофильных гидролитических бактерий, обладающих активностью амилазы, липазы, протеазы и целлюлазы. Амилазная активность культур, изолированных на среде при рН 11, была сопоставима с таковой изолятов, выделенных на селективных средах. Однако рН-зависимость ферментов этих изолятов различалась. Наибольшую активность амилазы у культур, полученных на среде с рН 11 и 8, отмечали при рН 10 и 6 соответственно. В то же время, удельная активность внеклеточной липазы изолятов *P. peli*, выделенных при рН 8, была наибольшей при рН 11. Этот факт можно объяснить тем, что большинство известных амилаз наиболее активны в нейтральной и кислой среде (Mc Tighe et al., 1995; Febriani et al., 2019), поэтому

для поиска фермента с максимумом активности в щелочной области следует вести выделение культур в экстремально щелочных условиях. Липазы из большинства источников, в том числе липазы псевдомонод (Rios et al., 2018), более активны в щелочной среде, в результате чего для выделения из экстремальных биотопов культур со щелочными липазами может быть использована среда, близкая к нейтральной.

Выделение бактериальных культур, обладающих щелочной амилазой, представляет определенные сложности. Так, из золя щелочного кремнезема, подверженного процессам гниения, было выделено лишь 2 изолята с амилазной активностью – *Acinetobacter* sp. и *Bacillus thuringiensis*, но эта активность была невысокой (Ren et al., 2014). Ранее сообщалось о выделении щелочных амилаз из клеток алкалофильных представителей рода *Bacillus* (Horikoshi, 1999; Saxena et al., 2007; Kubrak et al., 2010). Нами на среде с pH 11 были выделены изоляты *Bacillus aequororisi*, а также виды, о которых нет упоминания как о продуцентах щелочной амилазы: *Brevibacterium ptyocampae*, *Microbacterium kitamiense*, *Microcella putealis*, *Oerskovia paurometabola*, *O. enterophila*, *O. jenensis*.

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/(л мин); *Paenarthrobacter nitroquajacolicus* 14.7 мкмоль/(л мин) и 8.65 мкмоль/(л мин)), липазы (*Pseudomonas peli*, 0.83 мкмоль/(л мин) и 2.97 мкмоль/(л мин)), протеазы (*Arthrobacter halodurans*, 12 мм; *Micrococcus luteus*, 10 мм) и целлюлазы (*Microbacterium rugmaeum*, 0.49 ммоль/(л сут); *Lisobacter prati*, 0.47 ммоль/(л сут); *Metabacillus indicus*, 0.17 ммоль/(л сут)). Достаточно высокая активность гидролитических ферментов у многих изолятов, выделенных из содового шламохранилища, вероятно, связана с дефицитом органического субстрата. Известно, что повышенная продукция ферментов, осуществляющих гидролиз органических полимеров и других сложных субстратов, в условиях лимитирования по источнику углерода дает экологические преимущества микроорганизмам-продуцентам. При дальнейшей селекции выделенные изоляты будут представлять интерес для биотехнологии как продуценты ферментов, устойчивых в щелочной среде с повышенной минерализацией.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90103.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Безбородов А.М., Загустина Н.А. Липазы в реакциях катализа в органическом синтезе (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. С. 347–373.
- Bezborodov A.M., Zagustina N.A. Lipases in catalytic reactions of organic chemistry // Appl. Biochem. Microbiol. 2014. V. 50. P. 313–337.
- Блинов С.М., Максимович Н.Г., Найданова Н.Ф., Шлыков В.Г., Потапов С.С. Минералогические основы утилизации отходов ОАО “Березниковский содовый завод” // Минералогия техногенеза. 2003. Т. 4. С. 51–55.
- Борзенко С.В., Замана Л.В. Сульфатредукция как фактор формирования содовых вод озера Доронинское (Восточное Забайкалье) // Вестник Томского гос. ун-та. 2008. № 312. С. 188–193.
- Заварзин Г.А., Жилина Т.Н. Содовые озера – природная модель древней биосферы континента // Природа. 2000. № 2. С. 45–55.
- Новожилов Е.В., Пошина Д.Н. Биотехнологии в производстве целлюлозы для химической переработки (обзор) // Химия растительного сырья. 2011. № 3. С. 15–32.
- Рандагуруева А.А., Лаврентьева Е.В. Внеклеточная протеазная активность в природных образцах термальных источников Прибайкалья // Известия Иркутского гос. ун-та. Сер. Науки о Земле. 2009. Т. 2. № 2. С. 162–166.
- Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г. Метагеномный анализ родового состава бактериальной флоры грунта, воды и осадков нового и старого шламохранилища ОАО “Сода” (г. Березники, Пермский край) // Биомика. 2018. Т. 10. № 1. С. 24–27.
- 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. 81–94.
- Ali S.S., Habib I., Riaz T. Screening and characterization of alkaliphilic bacteria from industrial effluents // Punjab Univ. J. Zool. 2009. V. 24. P. 49–60.
- Anish R., Rahman M.S., Rao M. Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. in biopolishing of denims // Biotechnol. Bioeng. 2007. V. 96. P. 48–56.
- Atlas R.M. Handbook of Microbiological Media / Ed. Parks L.C. USA: CRC, 1993. 1079 p.

- Febriani, Rayyana, Ulya M., Oesman F., Akhmaloka, Iqbal-syah T.M.* Low molecular weight alkaline thermostable  $\alpha$ -amylase from *Geobacillus* sp. nov. // *Heliyon*. 2019. V. 5. e02171.
- Grant W.D., Sorokin D.Yu.* Distribution and diversity of soda lake alkaliphiles // *Extremophiles Handbook* / Eds. Horikoshi K., Antranikian G., Bull A., Robb F., Stetler K. Springer-Verlag, Tokyo, 2011. P. 27–54.
- Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P.* Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 59. P. 15–32.
- Hasan F., Shah A.A., Javed S., Hameed A.* Enzymes used in detergents: lipases // *Afr. J. Biotechnol.* 2010. V. 9. P. 4836–4844.
- Horikoshi K.* Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999. V. 63. P. 735–750.
- Jagtap S., Rao M.* Purification and properties of a low molecular weight 1,4- $\beta$ -D-glucan glucohydrolase having one active site for carboxymethyl cellulose and xylan from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 329. P. 111–116.
- Kalwasińska A., Felföldi T., Szab A.J., DejaSikora E., Kosobucki P., Walczak M.* Microbial communities associated with the anthropogenic, highly alkaline environment of a saline soda lime // *Ant. van Leeuwenhoek*. 2017. V. 110. P. 945–962.
- Kevbrin V.V.* Isolation and cultivation of alkaliphiles // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* / Eds. Mamo G., Mattiasson B. Springer, Cham, 2019. V. 172. P. 53–84.
- Kubrak O.I., Storey J.M., Storey K.B., Lushchak V.I.* Production and properties of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. BKL20 // *Can. J. Microbiol.* 2010. V. 56. P. 279–288.
- Margesin R., Feller G., Hämmerle M., Stegner U., Schinner F.* A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil // *Biotechnol. Lett.* 2002. V. 24. P. 27–33.
- Mc Tighe M.A., Kelly C.T., Doyle E.M., Fogarty W.M.* The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus* sp. IMD 370 // *Enzyme Microb. Technol.* 1995. V. 17. P. 570–573.
- Oren A.* Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms // *Environ. Technol.* 2010. V. 31. P. 825–834.
- Ren L., Han Y., Yang S., Tan X., Wang J., Zhao X., Fan J., Dong T., Zhou Z.* Isolation, identification and primary application of bacteria from putrid alkaline silica sol // *Front. Chem. Sci. Eng.* 2014. V. 8. P. 330–339.
- Rios N.S., Pinheiro B.B., Pinheiro M.P., Bezerra R.M., Sousa dos Santos J.C., Gonçalves L.R.B.* Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications // *Process Biochem.* 2018. V. 75. P. 99–120.
- Roadcap G.S., Sanford R.A., Jin Q., Pardinias J.R., Bethke C.M.* Extremely alkaline (pH > 12) ground water hosts diverse microbial community // *Ground Water*. 2006. V. 44. P. 511–517.
- Sarethy I.P., Saxena Y., Kapoor A., Sharma M., Sharma S.K., Gupta V., Gupta S.* Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 38. P. 769–790.
- Saxena R. K., Dutt K., Agarwal L., Nayyar P.* A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5 // *Biores. Technol.* 2007. V. 98. P. 260–265.
- Sharma K.M., Kumar R., Panwar S., Kuma A.* Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties // *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2017. V. 15. P. 115–126.
- Sorokin D.Y., Banciu H.L., Muzyer G.* Functional microbiology of soda lakes // *Curr. Opin. Microbiol.* 2015. V. 25. P. 88–96.

## Isolation and Identification of Alkalitolerant Bacteria with Hydrolytic Activity from Soda Storage

A. V. Shilova<sup>1,\*</sup>, A. Yu. Maksimov<sup>1,2</sup>, and Yu. G. Maksimova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Urals Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia*

<sup>2</sup>*Perm State National Research University, Perm, 614990 Russia*

\*e-mail: A.Shilova-IEGM@yandex.ru

Received July 8, 2020; revised August 31, 2020; accepted November 9, 2020

**Abstract**—From a technogenic soda sludge storage, 58 cultures of alkalotolerant bacteria with amylase, lipase, protease, and cellulase activities were isolated and identified using a medium with selective substrates in the absence of extreme conditions (pH 8) and a rich medium with pH 11 without selective substrates. The effect of pH and NaCl concentration on the growth and hydrolytic activity of *Pseudomonas peli*, *Paenarthrobacter nitroquajacolicus* and *Microbacterium kitamiense* with lipase and amylase activities was studied. Amylases of the cultures isolated on media with pH 11 and 8 were shown to exhibit the highest activity at pH 10 and 6, respectively, while the specific activity of extracellular lipase of *P. peli* isolated at pH 8 reached its maximum at pH 11. On the medium with pH 11, *Bacillus aequororis*, *Brevibacterium pityocampae*, *Microbacterium kitamiense*, *Microcella putealis*, *Oerskovia paurometabola*, *O. enterophila*, *O. jenensis* with alkaline amylase activity were isolated.

**Keywords:** soda lake, soda sludge storage, alkaliphiles, alkalitolerant microorganisms, hydrolytic activity, amylase, lipase, protease, cellulase