

БИОПЛЕНКИ СО СТЕН КАПОВОЙ ПЕЩЕРЫ КАК ИСТОЧНИК ПРОДУЦЕНТОВ ГИДРОЛАЗ

© 2024 г. У. Курди^а, Г. Ю. Яковлева^{а, *}, О. Н. Ильинская^а

^аКазанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

*e-mail: yakovleva_galina@mail.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 26.10.2023 г.

Принята к публикации 28.10.2023 г.

Современные исследования бактериальных сообществ экстремальных экосистем в основном направлены на анализ биоразнообразия микроорганизмов методами молекулярной биологии. Культивируемые бактерии карстовых пещер представляют собой уникальную группу микроорганизмов, биохимический потенциал которых мало изучен. В настоящей работе с биопленок на стенах Каповой пещеры (заповедник “Шульган-Таш”, Башкортостан) выделены и охарактеризованы бактерии с целью оценки способности идентифицированных изолятов к продукции внеклеточных гидролитических ферментов. Большинство выделенных бактерий (89%) являются представителями филума *Proteobacteria*, остальные относятся к филумам *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, на которые приходится 5, 4 и 2% изолятов, соответственно. Штаммы с высоким уровнем активности секретируемых протеаз, РНКаз и амилаз, были идентифицированы как *Stenotrophomonas rhizophila*, *Lysinibacillus fusiformis* и *Pseudomonas stutzeri*, соответственно.

Ключевые слова: карстовая пещера, биоразнообразие, культивируемые бактерии, РНКазы, протеазы, амилаза

DOI: 10.31857/S0026365624020101

Пещера Шульган-Таш, или Капова, известна в мире благодаря наскальным рисункам, относящимся к Верхнему палеолиту (рис. 1).

Как молекулярные, так и традиционные методы культивирования, примененные к анализу структуры бактериального сообщества этой пещеры, позволили идентифицировать представителей фил *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Nitrospirae*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* и *Acidobacteria*, а также выделить новые штаммы *Pseudomonas* (Galimzianova et al., 2020). Изучение биоразнообразия карстовых пещер служит отправной точкой для поиска полезных микробных метаболитов, имеющих перспективы практического использования. Секретируемые ферменты микроорганизмов широко используются в промышленности, сельском хозяйстве и медицине. Протеазы широко используются в пищевой, кожевенной и кормовой промышленности, а также в производстве моющих средств (Abdul Razzaq et al., 2019). Амилаза занимает примерно 25% мирового рынка ферментов (Reddy et al., 2007). Амилазы широко используются в хлебопекарной, пивоваренной, алкогольной промышленности и других пищевых технологиях (Gopinath et al., 2017). Внеклеточные бактериальные РНКазы, обладающие значительным потенциалом в качестве противовирусных (Ilinskaya, Shah-Mahmud, 2014; Shah Mahmud et al., 2017, 2018)

и противоопухолевых средств (Mitkevich et al., 2015; Ilinskaya et al., 2016; Surchenko et al., 2020), являются перспективными агентами для медицины.

Целью настоящей работы было охарактеризовать культивируемое бактериальное сообщество, собранное путем соскоба видимых колоний или биопленок со стен Каповой пещеры, и оценить способность изолятов синтезировать секретируемые гидролитические ферменты, а именно РНКазы, протеазы и амилазы.

Сообщества, отобранные с семи образцов видимых колоний или биопленок со стен разных участков пещеры, культивировали на жидких средах Лурия–Бертани (LB), Ризонера 2А (R2A) и Гаузе. Для выделения отдельных бактерий использовали как глубинные, так и поверхностные посевы. Чистые культуры идентифицировали на основании секвенирования гена 16S рРНК (области V3–V4). Полученные последовательности сравнивали с геномной базой данных Национального центра биологической информации (NCBI) с использованием алгоритма BLAST для нуклеотидов (BLASTn) (Zhanget al., 2000).

Скрининг бактерий на способность синтезировать секретируемые рибонуклеолитические, протеолитические и амилаолитические ферменты

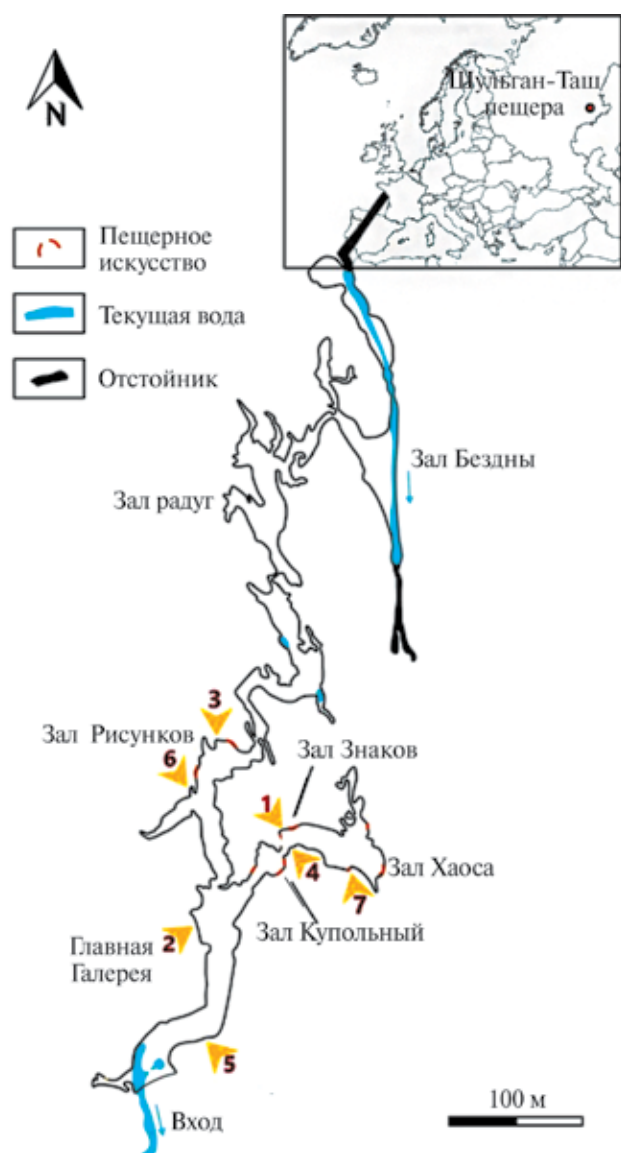


Рис. 1. Карта пещеры Шульган-Таш с обозначением мест отбора образцов для исследования.

проводили на следующих синтетических средах, соответственно: (а) — бесфосфорная среда, pH 8.5, г/л: Трис — 6.05; KCl — 5.0; NaCl — 1.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2.0; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ — 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ — 2.0; агар — 20.0. Перед инокуляцией в среду добавляли 40% глюкозу (12.5 мл/л) и дрожжевую РНК («Вектор», Новосибирск, Россия) до конечной концентрации 5 мг/мл. (б) — среда, содержащая (г/л): дрожжевой экстракт — 5.0; казеин — 5.0; NaCl — 5.0; агар-агар — 20.0; (в) — мясоептонный агар с 0.8% крахмала.

Изоляты выращивали на чашках Петри с вариантами сред (а, б, в) в течение 18 ч при 30°C. Активность гидролаз оценивали путем измерения зон просветления вокруг колоний, выращенных на соответствующем субстрате (РНК, казеин, крахмал) после заливки чашек 5% раствором 1н

HCl (среда а), трихлоруксусной кислоты (среда б) и раствором Люголя (среда в) для визуализации зон гидролиза. Коэффициент гидролазной активности изолята рассчитывали как соотношение радиуса колонии, включая зону прозрачности вокруг нее, к радиусу самой колонии. Согласно методике определения уровня активности гидролаз, коэффициент ферментативной активности, равный единице, отражает отсутствие активности, поскольку в этом случае колония изолята не образует вокруг зоны лизиса субстрата. Коэффициент со значением больше единицы отражает активность секретируемого фермента. Изоляты с самой высокой метаболической активностью были отобраны для дальнейшего секвенирования полноразмерного гена 16S рРНК.

Анализ альфа-разнообразия культивируемых бактерий в биопленках показал, что образец 7 обладает наибольшим таксономическим разнообразием, а образцы 2 и 3 — наименьшим (табл. 1).

99 из 102 бактерий были идентифицированы до уровня рода или семейства. Большинство выделенных бактерий (89%) оказались представителями филума *Proteobacteria*, тогда как остальные изоляты разделились между тремя другими филумами, а именно *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, на которые пришлось 5, 4 и 2% изолятов, соответственно. Два изолята были идентифицированы только на уровне семейства как *Burkholderiaceae* и *Enterobacteriaceae* (рис. 2а). Количеством (42 изолята) преобладали представители рода *Pseudomonas*.

Разнообразие бактериальных сообществ активно изучается в пещерах Австралии, Китая, Италии, Испании и Турции (Holmes et al., 2001; Schabereiter-Gurtner et al., 2004; Zhou et al., 2007; Ahamada Rachid, Doğruöz Güngör, 2023; Leuko et al., 2017). В большинстве этих пещер выявлено присутствие девяти групп доминантных бактерий: *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes*, *Firmicutes*, *Nitrospirae*, *Actinobacteria*, а также *Archaea*. Преобладание представителей филума *Proteobacteria* зафиксировано также и в Каповой пещере.

Установлено, что 6 изолятов вообще не секретировали гидролазы, тогда как 73 изолята проявили протеазную активность, 57 изолятов — амилазную активность и 71 изолят — внеклеточную РНКазную активность, а 39 изолятов обладали всеми тремя внеклеточными ферментативными активностями (рис. 2б).

Самой высокой протеазной активностью обладали представители родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter* и *Yersinia*. Изоляты родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Yersinia*, *Acinetobacter*, *Lysinibacillus*, *Polaromonas* и *Caulobacter* показали наибольший уровень активности РНКазы, а родов *Pseudomonas*, *Serratia*, *Yersinia* и *Acinetobacter* — амилазы.

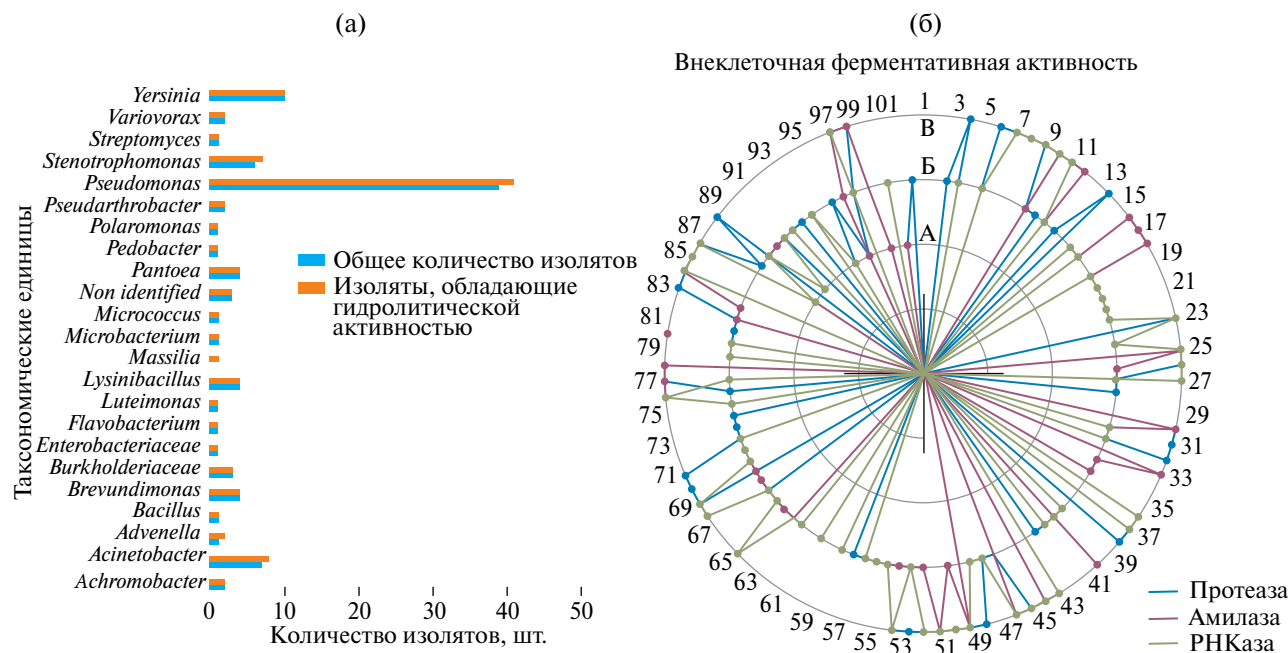


Рис. 2. Количество идентифицированных бактериальных изолятов (а) и их гидролитическая активность (б). На рисунке (а): * — изолят определен только до уровня семейства; на рисунке (б) — номера изолятов указаны по окружности; А — значение коэффициента ферментативной активности равно 1.0, Б — равно 1.5, В — равно 2.0.

Изолят с самой высокой протеазной активностью (изолят 7) был идентифицирован как *Stenotrophomonas rhizophila*, изолят с самой высокой РНКазной активностью (номер 27) — как *Lysinibacillus fusiformis*, изолят с самой высокой амилазной активностью (номер 1) — как *Pseudomonas stutzeri*. Ранее сообщалось о способности *Stenotrophomonas rhizophila* секретировать протеазы (Lich et al., 2022), *Pseudomonas stutzeri* — амилазу (Schmidt et al., 1979). Секретируемая РНКазы *Lysinibacillus fusiformis* обнаружена впервые.

Результаты проведенных исследований согласуются с данными литературы, подтверждающими доминирование представителей филума *Proteobacteria* в сообществах культивируемых бактерий, изолированных в карстовых пещерах, и открывают перспективы использования активных продуцентов гидролитических ферментов в практических целях.

Таблица 1. Таксономическое разнообразие культивируемых бактерий внутри сообществ со стен Каповой пещеры

№ образца	Число изолятов	R	Индекс Шеннона-Винера	Место отбора биопленок	Морфотип биопленок со стен Каповой пещеры
1	15	4	1.285	1 этаж, зал Знаков, северо-западная стена	Белые, шаровидные
2	9	2	0.678	1 этаж, низ колодца, западная стена	Белые, плоские с волнистым краем
3	11	2	0.678	2 этаж, арка зала Рисунков	Бежевые выпуклые
4	13	3	0.798	1 этаж, начало зала Знаков, южная стена	Беловато-желтые коралловидные
5	8	2	0.697	1 этаж, зал Сталагмитовый	Синие-оливковые крупнозернистые
6	26	6	1.36	2 этаж, начало Большого западного тупика	Оливковые крупнозернистые
7	17	6	1.61	1 этаж, зал Купольный, восточная стена	Коричневые с белой обводкой

Примечание. Индексы альфа-разнообразия: R – количество таксонов; индекс Шеннона-Винера – равномерность распределения таксономических единиц.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Центров Программы стратегического академического лидерства КФУ (Приоритет-2030).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование поддержано грантом РНФ № 22-24-00036.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Галимзянова Н.Ф., Гильванова Е.А., Рябова А.С., Гуватова З.Г., Кудряцева А.В., Мелентьев А.И. Филогенетическое разнообразие прокариотов в микробных сообществах скальных поверхностей пещеры Шульган-Таш (Капова), южный Урал // Экобиотех. 2020. Т. 3. № 3. С. 298–304.

Ahamada Rachid N., Doğruöz Güngör N. Major impacts of caving activities on cave microbial diversity: case study of Morca Cave, Turkey // Int. Microbiol. 2023. V. 26. P. 179–190.

Gopinath S.C., Anbu P., Arshad M.K., Lakshmi Priya T., Voon C.H., Hashim U., Chinni S.V. Biotechnological processes in microbial amylase production // Biomed. Res. Int. 2017. Art. 1272193. <https://doi.org/10.1155/2017/1272193>

Holmes A.J., Tujula N.A., Holley M., Contos A., James J.M., Rogers P., Gillings M.R. Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia // Environ. Microbiol. 2001. V. 3. P. 256–264.

Ilinskaya O.N., Shah-Mahmud R.S. Ribonucleases as antiviral agents // Mol. Biol. 2014. V. 48. P. 615–623.

Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E., Ulyanova V., Kayumov A., Barreto G. Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase) // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1863 (7 Pt A). P. 1559–1567.

Leuko S., Koskinen K., Sanna L., D'Angeli I.M., De Waele J., Marcia P., Moissl-Eichinger C., Rettberg P. The influence of

human exploration on the microbial community structure and ammonia oxidizing potential of the Su Bentu limestone cave in Sardinia, Italy // PLoS One. 2017. V. 12. Art. e0180700.

Lich N.Q., Thao T.T. P., Huy N.D. Characterization of extracellular protease from *Stenotrophomonas rhizophila* MT1 isolated from aquaculture sludge waste // Appl. Ecol. Environ. Res. 2022. V. 20. P. 2409–2423.

Mitkevich V.A., Pace C.N., Koschinski A., Makarov A.A., Ilinskaya O.N. Cytotoxicity mechanism of the RNase Sa cationic mutants involves inhibition of potassium current through Ca^{2+} -activated channels // Mol. Biol. 2015. V.49. P. 933–938.

Reddy L., Wee Y.-J., Yun J.-S., Ryu H.-W. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches // Bioresour. Technol. 2008. V. 99. P. 2242–2249.

Schabereiter-Gurtner C., Saiz-Jimenez C., Piñar G., Lubitz W., Rölleke S. Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonín and La Garma) // FEMS Microbiol. Ecol. 2004. V. 47. P. 235–247.

Schmidt J., John M. Starch metabolism in *Pseudomonas stutzeri*. I. Studies on maltotetraose-forming amylase // Biochim. Biophys. Acta. 1979. V. 566. P. 88–99.

Shah Mahmud R., Mostafa A., Müller C., Kanrai P., Ulyanova V., Sokurenko Y., Dzieciolowski J., Kuznetsova I., Ilinskaya O., Pleschka S. Bacterial ribonuclease binase exerts an intra-cellular anti-viral mode of action targeting viral RNAs in influenza A virus-infected MDCK-II cells // Virol. J. 2018. V. 15. Art. 5.

Shah Mahmud R., Müller C., Romanova Y., Mostafa A., Ulyanova V., Pleschka S., Ilinskaya O. Ribonuclease from *Bacillus* acts as an antiviral agent against negative- and positive-sense single stranded human respiratory RNA viruses // Biomed. Res. Int. 2017. Art. 5279065.

Surchenko Y.V., Dudkina E.V., Nadyrova A.I., Ulyanova V.V., Zelenikhin P.V., Ilinskaya O.N. Cytotoxic potential of novel bacillary ribonucleases binase and balifase // BioNanoSci. 2020. V. 10. P. 409–415.

Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences // J. Comput. Biol. 2000. V. 7. P. 203–214.

Zhou J.P., Gu Y.Q., Zou C.S., Mo M.H. Phylogenetic diversity of bacteria in an earth-cave in Guizhou province, southwest of China // J. Microbiol. 2007. V. 45. P. 105–112.

Biofilms from the Kapova Cave Walls as a Source of Hydrolase Producers

W. Kurdy¹, G. Yu. Yakovleva^{1, *}, and O. N. Ilyinskaya¹

¹Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008 Russia

*e-mail: yakovleva_galina@mail.ru

Received October 13, 2023; revised October 26, 2023; accepted October 28, 2023

Abstract—The studies of bacterial communities from extreme niches are presently aimed mainly at analyzing the biodiversity of microorganisms using molecular biology methods. Cultivated bacteria from karst caves represent a unique group of microorganisms, the biochemical potential of which has been poorly studied. In the present work, bacteria from biofilms on the walls of the Kapova Cave (Shulgan-Tash Nature Reserve, Bashkortostan) were isolated and characterized in order to assess the ability of identified isolates to produce extracellular hydrolytic enzymes. Most of the isolates (89%) were members of the phylum *Proteobacteria*, with the remaining ones belonging to the phyla *Actinobacteria*, *Firmicutes*, and *Bacteroidetes*, which accounted for 5, 4, and 2% of the isolates, respectively. Strains with high levels of secreted protease, RNase, and amylase activity were identified as *Stenotrophomonas rhizophila*, *Lysinibacillus fusiformis*, and *Pseudomonas stutzeri*, respectively.

Keywords: karst cave, biodiversity, cultivated bacteria, RNase, protease, amylase