

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ НИТРИЛОВ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ШТАММАМИ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫМИ НА ТЕРРИТОРИИ ПЕРМСКОГО КРАЯ

Овечкина Г.В., Кузнецова М.В., Максимов А.Ю., Гусев В.А., Ремезовская Н.Б.,
Демаков В.А.

*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия
mar@iegm.ru*

Акрилонитрил, акриламид и его производные - высокотоксичные синтетические соединения, антропогенные загрязнители окружающей среды [1]. Микроорганизмы, активно утилизирующие нитрилы или амиды, являются важнейшим фактором детоксикации данных загрязнений и перспективным инструментом для локальной очистки стоков, жидких и твердых отходов промышленности [2].

Ранее из почвы, отобранной на территории Пермского края, нами было изолировано 40 штаммов микроорганизмов, способных использовать изобутиронитрил в качестве единственного источника углерода и азота [3]. Таксономическая характеристика микроорганизмов проводилась с применением культурально-морфологических, хемотаксономических, физиолого-биохимических и генетических методов (по генам 16S РНК). Ферментативная активность определялась методом газовой хроматографии или спектрофотометрически по скорости образования амида или кислоты. Детекция генов, кодирующих ферменты утилизации нитрилов, проводилась методом ПЦР-анализа.

Установлено, что из 22 штаммов грамположительных бактерий 14 принадлежат к роду *Rhodococcus*, остальные - к родам *Microbacterium*, *Citreobacterium*, *Nocardia* и *Aureobacterium*. Грамотрицательные микроорганизмы представлены родами *Pseudomonas*, *Azomonas*, *Azotobacter* и *Acidovorax*. Оценка соотношения представителей разных родов бактерий показала превалирование представителей рода *Rhodococcus* среди штаммов, обладающих нитрилгидратазной или/и нитрилазной активностью (табл. 1).

Установлено, что пятнадцать штаммов конвертируют нитрильные соединения посредством фермента нитрилазы. Нитрилгидратазной системой метаболизма нитрилов обладают восемь штаммов бактерий. Конверсия ацетонитрила и акрилонитрила проводилась при 25°C и 50°C (табл. 1). Максимальная активность нитрилгидратазы зарегистрирована у штаммов *R. rhodochrous* K10(Ж2)р и *R. rhodochrous* K17(P) – 204 ЕД (по акриламиду) и 145 ЕД (по ацетамиду), соответственно. Скорость конверсии ацетонитрила в ацетат при 50°C у *Pseudomonas* sp. Б5-9 была в 10 раз выше, чем при 25°C, у штамма K10(P) - в 16 раз, а у *Azomonas* sp. K15-6 накопление ацетата зарегистрировано только при 50°C, и скорость конверсии не снижалась в течение трех часов реакции, что согласуется с литературными данными о термостабильности нитрилаз [4]. Путем направленной селекции с использованием хлор- и фторацетамида отобраны два штамма, *Nocardia* sp. K10(P) и *R. erythropolis* Б4-4, обладающие высокой нитрилазной активностью в отношении широкого ряда алифатических нитрилов.

В процессе конверсии ацетонитрила/акрилонитрила при 50°C у ряда культур, обладающих нитрилгидратазно-амидазной ферментной системой, детектировалось накопление ацетата без образования амида. Это связано с тем, что у данных микроорганизмов присутствуют оба пути гидролиза нитрилов, и при высоких температурах активируется фермент нитрилаза, конвертирующий нитрилы непосредственно в соответствующие кислоты и аммиак. Полученные результаты подтверждены данными ПЦР-анализа [5].

Таблица 1. Конверсия ацетонитрила и акрилонитрила почвенными штаммами

Культура		ацетамид, МКМОЛЬ МГ×МИН		ацетат натрия ММОЛЬ/Г×Ч		акриламид, МКМОЛЬ МГ×МИН		акриловая кислота ММОЛЬ/Г×Ч	
		25°С	50°С	25°С	50°С	25°С	50°С	25°С	50°С
Лаб. шифр	Род, вид								
К10(Ж1)	<i>R. luteus</i>	0	0	3	4	0	0	0	0,1
К10(Ж2)	<i>Pseudomonas sp.</i>	0,2	0	0	4	1	0,1	0,8	1,5
К10(Ж2)р	<i>R. rhodochrous</i>	0,2	0	0	6	204	13	0	0
К10(Б)	<i>R. erythropolis</i>	0,1	0	0	12	1,1	0	0	0,2
К10(Р)	<i>Nocardia sp.</i>	0	0	1	16	0	0	0	4,2
К10(ОМ)	<i>R. erythropolis</i>	0,2	0	0	2	0,3	0	0	0
К12(Б)	<i>Azomonas sp.</i>	0	0	2,3	0,1	0	0	4	3
К12(Ч)	<i>Azotobacter sp.</i>	0	0	4	1	0	0	0	0
К13(13)	<i>Acidovorax sp.</i>	0,5	0	0	1,4	1	0,5	0	0
К17(Ж)	<i>P. fluorescens</i>	1,5	0,4	0	0	0	0	0	0
К17(Р)	<i>R. rhodochrous</i>	10	145	0	0	0	0	0	0
К15-6	<i>Azomonas sp.</i>	0	0	0	2,3	0	0	0,6	0,1
Б2-4	<i>R. erythropolis</i>	0	0	12	0,6	0	0	0	0
Б4-4	<i>R. erythropolis</i>	0	0	10,2	4	0	0	127	65
Б5-4	<i>R. erythropolis</i>	5,2	0	0	5	8	2	0	12
Б5-9	<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	0,93	9,07	0	0	0	0
Б20-8	<i>R. erythropolis</i>	0	0	0,9	0,3	0	0	20	6

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что штаммы бактерий, утилизирующие нитрилы карбоновых кислот, широко представлены в почве. Их распространение, вероятно, связано с поступлением в почву нитрильных метаболитов растительного происхождения. Исходя из полученных результатов, выделенные штаммы или их ассоциации могут быть использованы для детоксикации сточных вод и биоремедиации почв, загрязненных нитрильными соединениями.

Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН «Научные основы сохранения биоразнообразия России», программы Отделения биологических наук РАН «Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами», программы совместных интеграционных исследований УрО РАН совместно с учеными СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Акрилонитрил. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. - Женева: Всемирная организация здравоохранения, 1987. - Вып. 28. - 114 с.
2. Banerjee A., Sharma R., Banerjee U.C. The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2002. - 60. - P. 33-44.
3. Кузнецова М.В., Ремезовская Н.Б., Максимова Ю.Г., Демаков В.А. Исследование биоразнообразия микроорганизмов, утилизирующих нитрилы карбоновых кислот // Международная научно-практическая конференция «Проблемы и перспективы реабилитации техногенных экосистем». - Астрахань, 2004.
4. Cowan D., Cramp R., Pereira R. et al. Biochemistry and biotechnology of mesophilic and thermophilic nitrile metabolizing enzymes // Extremophiles. - 1998. - V. 2, N. 3. - P. 207-216.
5. Максимов А.Ю., Кузнецова М.В., Овечкина Г.В., Козлов С.В., Максимова Ю.Г., Ремезовская Н.Б., Демаков В.А. ПЦР-анализ нитрилгидратаз штаммов *R. erythropolis* 84, *R. ruber* gt1 и ряда почвенных изолятов // Материалы Всероссийского симпозиума «Биотехнология микробов». - Москва, 2004. - С.50.