

SELECTION AND CHARACTERISTICS OF UKRAINIAN STRAIN OF UREASE-PRODUCING BACTERIA FOR MICROBIAL PRODUCTION OF SOIL BIOFIXATIVE

V. Stabnikov

National University of Food Technologies

Key words:

Urease-producing bacteria

Physiological properties

Soil biofixative

Biotechnology

Article history:

Received 26.11.2013

Received in revised form
10.12.2013

Accepted 22.12.2013

Corresponding author:

V. Stabnikov

Email:

npnuht@ukr.net

ABSTRACT

The active study of the production of soil biofixatives for their application in construction are conducted world-wide in the recent years. Specific strains of microorganisms are the main component of soil biofixatives, so, their production is a new perspective development in the biotechnology. Selection of Ukrainian strain of urease-producing bacteria for its use in the processes of soil biofixation was performed. Characteristics and physiological properties of the selected strain were compared with the properties of known strains which are used for soil biofixation.

ВИДІЛЕННЯ І ХАРАКТЕРИСТИКА УКРАЇНСЬКОГО ШТАМУ УРЕАЗА-ПРОДУКУЮЧИХ БАКТЕРІЙ ДЛЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ВИРОБНИЦТВА БІОЗАКРІПЛЮВАЧА ҐРУНТУ

В. П. Стабніков

Національний університет харчових технологій

У статті проведено відбір українського штаму уреазо-продукуючих бактерій для його використання в процесах закріплення ґрунтів при будівництві. Наведено характеристику фізіологічних властивостей відібраного штаму та здійснено його порівняння з відомими штамами, що застосуються для біозакріплення ґрунтів.

Ключові слова: *уреазо-продукуючі бактерії, фізіологічні властивості, біозакріплення ґрунтів, біотехнологія.*

В останні роки у світі ведуться активні дослідження з біотехнологічного виробництва біозакріплювачів ґрунтів для їх використання у різних галузях господарської діяльності людини [1—2]. Основним компонентом біозакріплювачів ґрунтів є специфічні штами мікроорганізмів, тобто їх виробництво є новим перспективним направленням біотехнології. Одним із головних завдань

при створенні біозакріплювачів ґрунтів є вибір уреаз-продукуючих бактерій. Найбільш важливим критерієм при селекції штамів для виробництва біозакріплювачів ґрунтів є їхня здатність синтезувати активну уреазу. Здатність до синтезу ферменту уреазу має широкий спектр мікроорганізмів [3]. Синтез уреазу може регулюватися азотом, він може бути індукбельним або конститутивним [4]. Для багатьох мікроорганізмів, наприклад, *Sporosarcina pasteurii*, уреазу є конститутивним ферментом і її синтез не залежить від наявності в середовищі азотистих компонентів та їх концентрації, тоді як для інших, наприклад, *Proteus mirabilis* [4], утворення уреазу індукується наявністю в середовищі сечовини. В інших мікроорганізмів, наприклад у бактерій *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus denitrificans*, *Hydrogenomonas* sp. [5], синтез уреазу репресується наявністю в середовищі амонію. Оскільки амоній є безпосереднім продуктом активності уреазу, пошук уреаз-продукуючих бактерій для біозакріплення ґрунтів слід вести серед мікроорганізмів, у яких уреазу є конститутивним ферментом і її синтез не залежить від наявності в середовищі азотистих компонентів та її концентрації. Серед уреаз-продукуючих бактерій є багато патогенів, наприклад, бактерія *Helicobacter pylori*, яка здатна інфікувати шлунок і викликати виразку (глибоке руйнування стінки шлунку) або хронічний гастрит, а також опортуністичних патогенів, таких як *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*. Активні непатогенні продуценти уреазу можуть бути знайдені серед алкалофільних і галотолерантних спороутворюючих бактерій, таких як *Sporosarcina pasteurii*, що раніше називалася *Bacillus pasteurii*. Відомо, що поширена ґрунтова бактерія *Bacillus pasteurii*, може синтезувати значну кількість уреазу у природному місці існування [6]. Наприклад, штам *B. pasteurii*, який було застосовано в дослідженні К.Л. Бечмеєра зі співавторами [3], синтезував внутрішньоклітинну конститутивну уреазу в кількості до 1% від сухої маси клітин. Таким чином, вибір мікробного продуцента уреазу для застосування його в біозакріпленні ґрунтів доцільно вести серед спороутворюючих бактерій.

Наявність уреазної активності у бактерій обумовлює підвищення рН оточуючого середовища завдяки утворенню аміаку NH_3 , тобто мікробний продуцент повинен бути толерантним до лужного рН. Необхідними характеристиками мікробної уреазу для її успішного використання при закріпленні ґрунтів повинно бути зберігання активності за високої концентрації неорганічної солі (CaCl_2). Позитивним моментом також є збереження активності уреаз-продукуючих бактерій при їх зберіганні.

Отже, уреаз-продукуючі бактерії для виробництва біозакріплювачів ґрунтів повинні мати такі характеристики:

- бути біологічно безпечними;
- бути активними в геотехнічному середовищі з високою концентрацією солей;
- витримувати лужне рН середовища;
- зберігати тривалий час уреазну активність.

В Україні дослідження в галузі мікробного виробництва біозакріплювачів ґрунтів тільки розпочато. Мета пропонованого дослідження: виділення природного штаму уреаз-продукуючих бактерій з ґрунту України та вивчення можливості його застосування для виробництва біозакріплювача ґрунту.

Садовий піщаний ґрунт було використано як потенційне джерело уреазпродукуючих бактерій. Добриво, яке вносилося у цей ґрунт, містило сечовину. 10 г ґрунту вносили в 30 мл фізіологічного розчину (0,85% розчину NaCl), ретельно перемішували і відстоювали. Рідина, що знаходилася над осадом, слугувала вихідним матеріалом для отримання накопичувальної культури. Накопичувальні культури вирощували на раніше описаному поживному середовищі [7]: триптон-соевий бульйон DIFCO™, 30 г; сечовина, 20 г; NaCl, 100 г; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 12 мг; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 24 мг; фенол червоний, 10 мг; дистильована вода 1 л (ТСС). Такий високий вміст NaCl (100 г/л) використовувався тільки для виготовлення середовища для росту накопичувальних культур. У подальших дослідженнях концентрація NaCl у середовищі складала 10 г/л. Для детекції розвитку уреаз-продукуючих бактерій у середовище додавали індикатор фенол червоний (фенолсульфоталеїн), колір якого є жовтим при рН 6,8, але поступово змінюється на червоний, якщо рН підвищується до 8,2, і стає яскраво рожевим (пурпурним) при рН вище, ніж 8,2. Усі компоненти середовища, за винятком сечовини, стерилізували при 121°C протягом 15 хвилин. Концентрований розчин сечовини, 100 г/л, стерилізували фільтрацією через нітроцелюлозний фільтр з порами розміром 0,2 мкм для запобігання витратам сечовини під час стерилізації. 2 мл концентрованого розчину мікроелементів додавали до стерильного середовища [7]. Культивування проводили в умовах качання при 150 об/хв при 30°C протягом 6 діб. Накопичувальна культура, в якій колір змінився найшвидше і був найбільш інтенсивний, використовувалася для подальшої селекції чистих культур уреаз-продукуючих бактерій. Виділення чистих культур проводили висівом 10-кратних розведень накопичувальної культури на агаризоване ТСС середовище з додаванням індикатору фенолу червоного в чашках Петрі.

Для ідентифікації штаму уреаз-продукуючих бактерій використовували полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), для ампліфікації гена 16S рибосомальної РНК та його секвенування застосовували універсальних еубактеріальних праймерів 27F та 1492R [8]. Отримані продукти ПЛР були очищені та секвеновані за допомогою капілярного аналізатора ABI PRISM3730xl DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) та набору реактивів BigDye Terminator Cycle Sequencing ready-reaction kit (Applied Biosystems). Праймери 27F, 530F, 926F, 519R, 907R і 1492R були використані для секвенування обох ниток гена 16S рибосомальної РНК. Часткові послідовності нуклеотидів були зібрані для створення повної послідовності нуклеотидів. Послідовність порівнювалася з іншими послідовностями, які представлені в базі даних Національного центру біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnological Information, NCBI), для чого було використано комп'ютерну пошукову програму BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Фізіологічні властивості штаму визначалися при періодичному культивування, що проводилося так, як описано в праці [9]. Уреазна активність визначалася як кількість амонію, що утворилася в 1М розчині сечовини за хвилину [9].

Закріплення ґрунту проводили з використанням двох компонентів: (а) розчин кальцію-сечовини, що містив 82 г/л $CaCl_2$ та 90 г/л сечовини, рН дово-

дили 1 N HCl до 7,0; (б) бактеріальна суспензія, 8,4 г/л. Межа міцності при стиску зразка піску після біоцементації визначалася так, як описано у [9].

Високий вміст солі натрію у рідкому середовищі для отримання накопичувальних культур обумовлював розвиток галотолерантних бактерій, які є стійкими до високого осмотичного тиску геотехнічного середовища. Виділення чистих культур проводилося зі зразків, колір яких змінився на пурпурний. Зміна кольору засвідчила, що рівень рН вищий за 8,2 (перевірка показала, що рівень рН складає 8,5), тобто активними в зразках були тільки алкалофільні бактерії. Накопичувальну культуру, яку використовували для виділення чистих культур, нагрівали до 60 °С і витримували при цій температурі протягом 120 хвилин для переважного зберігання в активному стані спороутворюючих бактерій. Штами було ізольовано з індивідуальних колоній з уреазною активністю, яку підтвердила зміна кольору оточуючого середовища.

Уреазна активність штамів перевірялася при їх періодичному вирощуванні на рідкому середовищі в аеробних умовах протягом 6 діб при температурі 30 °С. Клітини штаму VUK5, який показав найвищу уреазну активність (табл.), були аеробними спороутворюючими Грам-позитивними паличками.

Таблиця 1. Уреазна активність виділених штамів, мМ прогідролізованої сечовини/хв

Штам	VUK1	VUK2	VUK3	VUK4	VUK5	VUK6	VUK7	VUK8
Уреазна активність	2,9	8,1	3,2	5,4	10,4	9,2	6,0	3,1

Штам VUK5 було ідентифіковано за допомогою ампліфікації та секвенування гена рРНК. Часткові послідовності нуклеотидів об'єднані для отримання повної послідовності нуклеотидів гена 16S рРНК, яка буда депонована в Генеральному банку Національного центру біотехнологічної інформації США під номером KC464455. Цей штам був представником роду *Bacillus* близьким до штаму *Bacillus* sp. VS1 (ідентичність = 99%), який був ізольований із піску з пляжу в Сінгапурі [10], та *Bacillus* sp. WB7 (ідентичність = 99%), який був ізольований із природних зразків Джакарти, Індонезія [11].

При періодичному культивуванні в умовах аерації штам показав максимальну швидкість росту 0,09 год⁻¹ і максимальне накопичення біомаси 8,4 г/л сухої біомаси після трьох діб культивування (рис. 1). Уреазна активність культуральної рідини була 10,4 мМ прогідролізованої сечовини/хв, що порівняно зі значенням 13,3 мМ прогідролізованої сечовини/хв для *Sporosarcina pasteurii* ATCC 11859 [12] або 3,3 мМ

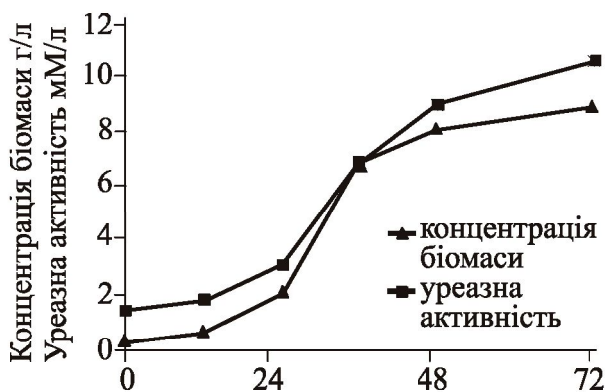


Рис. 1. Зміна параметрів періодичної культури *Bacillus* sp. UK5: концентрація біомаси, г сухої біомаси/л (▲); уреазна активність, М/хв (■).

прогідролізованої сечовини/хв для австралійського штаму *Bacillus* sp. [13], які були застосовані для мікробного осадження кальциту.

Уреазна активність культуральної рідини штаму *Bacillus* sp. VUK5 протягом восьми діб зберігання при 4°C не змінювалася, а потім постійно зменшувалася зі середньою швидкістю 0,18 мМ/доба.

Максимальна межа міцності на розрив (ММР) для вологого зразка піску після шести циклів біообробки становила 845 кПа. Для порівняння: ММР вологого біозакріпленого зразка піску склала 570 кПа у [14]. Фотографії піску до і після одного циклу біозакріплення були зроблені за допомогою стереомікроскопа (рис. 2). На знімках зафіксовано закріплення часток піску та підвищення щільності зразку піску після його біообробки за рахунок діяльності уреаз-продукуючих бактерій.

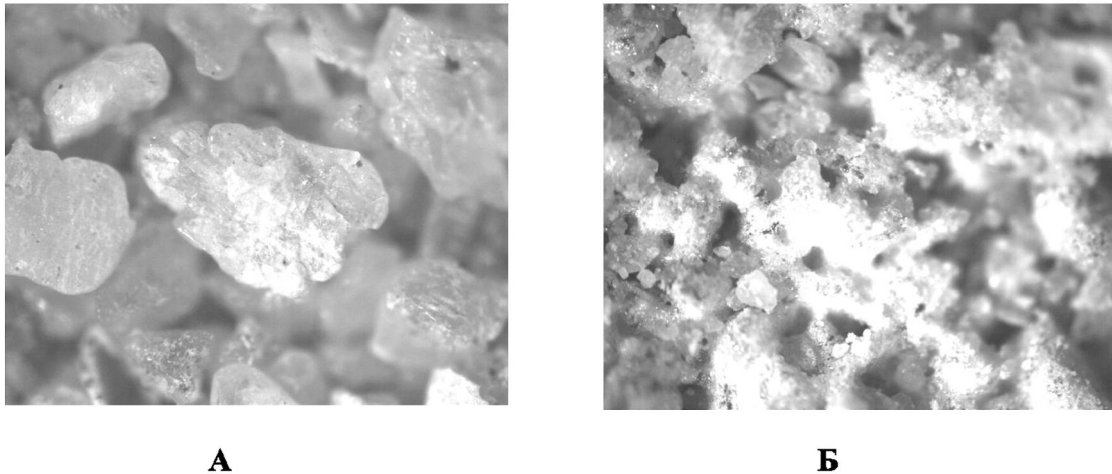


Рис 2. Фотографії піску (А) та піску після обробки *Bacillus* sp. (Б) (при збільшенні 40X)

Висновки

Ізольовано та ідентифіковано український штам *Bacillus* sp. VUK5, який є алкалофільними, галотолерантними, аеробними, спороутворюючими грам-позитивними паличками. Уреазна активність культуральної рідини складала близько 10 мМ прогідролізованої сечовини/хв, а межа міцності на розрив вологого зразка піску після біообробки із застосуванням цього штаму становила близько 850 кПа. Ці дані порівняні з відомими уреаз-продукуючими бактеріями, які застосовують для біозакріплення ґрунтів за рахунок мікробного осадження кальциту.

Література

1. *Ivanov V., Chu J.* Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil *in situ* // *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. — 2008. — v. 7, N 2. — P. 139—153.
2. *De Muynck W., De Belie N., Verstraete W.* Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. // *Ecological Engineering*. — 2010. — V. 36, N 2. — P. 118—136.

3. *Bachmeier K.L., Williams A.E., Warmington J.R., Bang S.S.* Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation // *Journal of Biotechnology* 2002. — V. 93, N 2. — P. 171—181.

4. *Mobley H.L., Island M.D., Hausinger R.P.* Molecular biology of microbial ureases // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. — 1995. — V. 59, N 3. — P. 451—480.

5. *Kaltwasser H., Krämer J., Conger W.R.* Control of urease formation in certain aerobic bacteria // *Archives of Microbiology*. — 1972. — V. 81, N 2. — P. 178—196.

6. *Ciurli S., Marzadori C., Benini S., Deiana S., Gessa C.* Urease from the soil bacterium *Bacillus pasteurii*: immobilization on Ca—polygalacturonate // *Soil Biology and Biochemistry*. — 1996. — V. 28, N 6. — P. 811—817.

7. *Stabnikov V., Chu J., Naeimi M., Ivanov V.* Formation of water-impermeable crust on sand surface using biocement // *Cement and Concrete Research*. — 2011. — V. 41, N 11. — P. 1143—1149.

8. *Lane D.J.* 16S/23S rRNA sequencing. In: *Stackebrandt E., Goodfellow M.* (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley and Sons, Chichester. — 1991. — P. 115—175.

9. *Стабников В.П.* Биотехнологія будівельних процесів і матеріалів // *Наукові праці НУХТ*. — 2012. — № 47. — С. 29—31.

10. *Chu J., Stabnikov V., Ivanov V.* Microbially induced calcium carbonate precipitation on surface or in the bulk of soil // *Geomicrobiology Journal*. — 2012. — V 29. — P. 544—549.

11. *Lisdiyanti P., Suyanto E., Ratnakomala S.F, Sari M.N., Gusmawati N.F.* Bacterial carbonate precipitation for biogrouting. In: *Proceedings of National Symposium on Ecohydrology, Jakarta*. — 2012. — P. 204—211.

12. *Whiffin V.S.* Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement. PhD thesis. School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University, Perth. — 2004. — 155 P.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА УКРАИНСКОГО ШТАММА УРЕАЗА-ПРОДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА БИОЗАКРЕПИТЕЛЯ ПОЧВЫ

В.П. Стабников

Национальный университет пищевых технологий

В статье проведен выбор украинского штамма уреазы-продуцирующих бактерий для его применения в процессах закрепления почв. Дана характеристика физиологических свойств отобранного штамма и проведено его сравнение с известными штаммами, используемыми для биозакрепления почв.

Ключевые слова: *уреазы-продуцирующие бактерии, физиологические свойства, биозакрепление почв, биотехнология.*