ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-1-2486
https://elibrary.ru/LMLTQJ

Оригинальная статья
https://fptt.ru

Гидролиз и окисление трудноразлагаемых субстратов микробными изолятами термальных источников

А. И. Дмитриева[1], Е. Р. Фасхутдинова[1,*], Т. А. Ларичев[1], Н. С. Величкович[1], В. Ю. Богер[1], Л. М. Аксенова[2]

[1] *Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия*

[2] *Всероссийский научно-исследовательский институт кондитерской промышленности, Москва, Россия*

Поступила в редакцию: 04.02.2023
Принята после рецензирования: 18.05.2023
Принята к публикации: 04.06.2023

**Е. Р. Фасхутдинова: faskhutdinovae.98@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-9711-2145*
А. И. Дмитриева: https://orcid.org/0000-0002-8764-4049
Т. А. Ларичев: https://orcid.org/0000-0002-3801-0023
Н. С. Величкович: https://orcid.org/0000-0002-9061-1256

© А. И. Дмитриева, Е. Р. Фасхутдинова, Т. А. Ларичев, Н. С. Величкович, В. Ю. Богер, Л. М. Аксенова, 2024

Аннотация.
Традиционные источники энергии загрязняют окружающую среду. Для снижения экологической нагрузки предлагается использовать альтернативный источник энергии на основе микроорганизмов – микробные топливные элементы. Еще одним полезным применением микробного топливного элемента является очистка сточных вод от трудноразлагаемых отходов. Целью исследования являлось изучение ферментативной способности изолятов термального источника Абаканский Аржан.
Объектами исследования служили изоляты родов *Geobacter*, *Thermomonas* и *Rhodopseudomonas*. Исследование кератинолитической активности осуществляли по ГОСТ Р 55987-2014. Определение хитинолитической активности проводили путем посева бактериальной суспензии уколом на чашки Петри со средой, содержащей хитин. Оценку липолитической активности осуществляли выращиванием изолятов в бульоне Штерна. Изучение способности изолятов к гидролизу ксилана проводили путем анализа скорости образования восстанавливающих сахаров. Целлюлазную активность изолятов измеряли по стандартной методике IUPAC. Каталазную активность оценивали на средах, содержащих 1 % бензин. Активность определяли газометрическим способом. Оптимальные параметры культивирования консорциумов определяли по количеству генерируемого напряжения.
Максимальной кератинолитической активностью обладал изолят *Geobacter*. Однако для изолята *Thermomonas* отмечена максимальная степень гидролиза белка – 80,1 ± 1,5 %. Изоляты *Geobacter* и *Rhodopseudomonas* проявляли большую литическую активность в отношении хитина – зоны лизиса превышали 3 мм. Изолят *Geobacter* достигал 350 ед. ксиланазной активности и 365 ед. целлюлазной активности; *Thermomonas* – 350 ед. ксиланазной активности и 360 ед. целлюлазной активности; *Rhodopseudomonas* – 310 ед. ксиланазной активности и 304 ед. целлюлазной активности. Максимальной каталазной активностью отличаются изоляты *Geobacter* и *Thermomonas* – 1,40 и 1,38 ед. активности соответственно. Максимальное генерирование энергии консорциумами изолятов осуществлялось при pH 8, температуре 45 °C и продолжительности культивирования 48 ч.
Изоляты *Geobacter*, *Thermomonas* и *Rhodopseudomonas*, выделенные из термального источника Абаканский Аржан, способны удалять трудноразлагаемые компоненты. Это делает перспективным их применение в биологической очистке сточных вод.

Ключевые слова. Экологически чистая энергия, экстремофильные микроорганизмы, ферментативная активность, микробный топливный элемент, трудноразлагаемые субстраты

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Минобрнауки России) (стипендия Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам, осуществляющим перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики на 2021–2023 гг., приказ Минобрнауки России от 26.01.2021 № 54, тема проекта «Энергоэффективная экологически чистая технология получения электроэнергии с использованием биомассы термальных источников»).

Для цитирования: Гидролиз и окисление трудноразлагаемых субстратов микробными изолятами термальных источников / А. И. Дмитриева [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 1. С. 27–36. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-1-2486

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-1-2486
https://elibrary.ru/LMLTQJ

Original article
Available online at https://fptt.ru/en

Hydrolysis and Oxidation of Recalcitrant Substrates by Microbial Isolates from Hot Springs

Anastasiya I. Dmitrieva[1], Elizaveta R. Faskhutdinova[1,*], Timothy A. Larichev[1], Natalia S. Velichkovich[1], Veronika Yu. Boger[1], Larisa M. Aksenova[2]

[1] *Kemerovo State University, Kemerovo, Russia*

[2] *All-Russian Scientific Research Institute of Confectionery Industry, Moscow, Russia*

Received: 04.04.2023
Revised: 18.05.2023
Accepted: 04.06.2023

**Elizaveta R. Faskhutdinova: faskhutdinovae.98@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-9711-2145*
Anastasiya I. Dmitrieva: https://orcid.org/0000-0002-8764-4049
Timothy A. Larichev: https://orcid.org/0000-0002-3801-0023
Natalia S. Velichkovich: https://orcid.org/0000-0002-9061-1256

© A.I. Dmitrieva, E.R. Faskhutdinova, T.A. Larichev, N.S. Velichkovich, V.Yu. Boger, L.M. Aksenova, 2024

Abstract.
Traditional energy sources pollute the environment. Microbial fuel cells are an alternative energy source that can reduce the environmental burden. Microbial fuel cells also remove recalcitrant wastes from wastewater. This research featured the enzymatic potential of microbial isolates obtained from the Abakan Arzhan thermal spring.
The study involved isolates of the genera *Geobacter*, *Thermomonas*, and *Rhodopseudomonas*. The keratinolytic analysis was in line with State Standard R 55987-2014. The chitinolytic activity was determined by injecting a bacterial suspension on Petri dishes with a chitin-containing medium. The lipolytic analysis involved cultivating the isolates in Stern's glycerol fuchsin broth. The xylan hydrolysis depended on the reducing sugars. The cellulase activity was measured according to the standard method recommended by the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). The catalase potential was evaluated by the gasometric method on 1% gasoline media. The optimal parameters of consortium cultivation were determined by the voltage generated.
The *Geobacter* isolate had the maximal keratinolytic activity while the *Thermomonas* isolate demonstrated the maximal protein hydrolysis (80.1 ± 1.5%). Both *Geobacter* and *Rhodopseudomonas* showed good lytic activity against chitin with the lysis zone of ≥ 3 mm. The *Geobacter* isolate demonstrated as many as 350 units of xylanase activity and 365 units of cellulase activity; *Thermomonas* had 350 units of xylanase activity and 360 units of cellulase activity; *Rhodopseudomonas* showed 310 units of xylanase activity and 304 units of cellulase activity. The maximal catalase properties belonged to *Geobacter* (1.40 units) and *Thermomonas* (1.38 units). The maximal energy generation by bacterial consortia occurred at pH 8 and 45°C after 48 h of cultivation.
In this research, isolates of the genera *Geobacter*, *Thermomonas*, and *Rhodopseudomonas* from the Abakan Arzhan thermal spring were able to remove recalcitrant components, thus demonstrating good prospects for biological treatment of industrial wastewater.

Keywords. Environmentally friendly energy, extremophilic microorganisms, enzymatic activity, microbial fuel cell, hard-to-decompose substrates

Funding. The research was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Minobrnauka) as part of the Grant of the President of the Russian Federation for young scientists and postgraduate students working in priority areas of modernization of the Russian economy (SP 2021–2023), project topic: Energy-efficient environmentally friendly technology for generating electricity from thermal spring biomass.

For citation: Dmitrieva AI, Faskhutdinova ER, Larichev TA, Velichkovich NS, Boger VYu, Aksenova LM. Hydrolysis and Oxidation of Recalcitrant Substrates by Microbial Isolates from Hot Springs. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(1):27–36. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-1-2486

Введение

Для удовлетворения основных потребностей человеку нужна энергия. Это необходимо для здоровья, повседневной жизни, коммуникаций и мобильности, а также социального и экономического развития [1]. Согласно прогнозам ученых к середине XXI столетия численность населения увеличится до 9 млрд. Закономерно, что вырастет и потребление энергии. Данные, полученные Управлением энергетической информации, свидетельствуют о том, что в период

с 2018 по 2050 гг. мировое потребление энергии вырастет почти вдвое [2].

Растущий мировой спрос на энергию стал причиной злоупотребления запасов ископаемого топлива. Это привело к большим объемам выбросов парниковых газов в атмосферу и загрязнению сточных вод другими токсичными отходами [3]. В 2019 г. на энергетический сектор приходилось около 40 % мирового выброса углекислого газа, что составляет около 13 Гт [4]. Такие большие объемы выбросов создают угрозу глобального потепления – острой уже сегодня экологической проблемы [5].

Одной из основных мер по предотвращению вышеуказанной проблемы является поиск возобновляемых альтернативных источников энергии [6]. Невозобновляемые источники энергии обладают высокой стоимостью, что делает переход на альтернативную энергию важным этапом для обеспечения энергетической безопасности и удовлетворения высокого спроса на энергию [2].

Перспективным способом получения альтернативной энергии является использование технологии микробного топливного элемента, т. е. бактериальный метаболизм для получения электроэнергии. Данная технология предполагает использование ячейки, разделенной ионообменной мембраной на две камеры. Микробный топливный элемент представляет собой биоэлектрохимическую систему, способную преобразовывать химическую энергию в электрическую путем микробного катализа [7]. Источником энергии служат жидкие органические отходы промышленных предприятий. В результате их переработки происходит высвобождение энергии [8]. Преимуществами использования микробного топливного элемента являются преобразование субстрата в энергию, возможность эксплуатации при различных температурах и pH, отсутствие затрат энергии на аэрацию [9]. Плюсом данной технологии является не только получение возобновляемой энергии, но и очистка сточных вод, используемых в качестве подложки для биомассы микроорганизмов.

Особое внимание в технологии получения экологически чистого топлива уделяется используемому биокатализатору – экстремофильным микроорганизмам. Экстремофильными называют микроорганизмы, которые способны к существованию в средах с экстремальными факторами – температурой, pH, давлением и соленостью [10, 11]. В результате деятельности человека некоторые экстремофилы приспособились к существованию в загрязненных средах. Например, в сточных водах либо в загрязненных пестицидами или тяжелыми металлами почвах [12].

Очистка сточных вод является перспективным применением микробного топливного элемента [13]. Существуют исследования, которые посвящены использованию сточных вод различных отраслей промышленности в качестве субстрата. Особое внимание уделяется сточным водам сельского хозяйства и пищевой промышленности. Сельскохозяйственные отходы образуются во время предуборочной, уборочной и послеуборочной деятельности [14]. Такие сточные воды могут легко подвергаться биодеградации из-за наличия в своем составе большого количества органических отходов, а также макро- и микроэлементов.

Свойства агроотходов различны в зависимости от местоположения их источников, климатических условий и др. [14]. Отходы птицеводства являются одними из легкодоступных и дешевых в обрабатывающей промышленности [15]. Однако отходы птицефабрик содержат такой трудноразлагаемый компонент, как кератин – фибриллярный белок, который входит в состав перьев. Традиционные методы утилизации кератиновых отходов (сжигание, захоронение, химический гидролиз и карбонизация) приводят к выбросам углекислого газа, твердых частиц или сажи (в случае сжигания), загрязнению сточных вод (в случае захоронения) и использованию дополнительных методов очистки от нежелательных продуктов реакций (в случае химического гидролиза агрессивными веществами) [16–18].

Хитин (полимер N-ацетилглюкозамина) является вторым по распространенности биоматериалом в природе после целлюлозы [19]. Данный полимер содержится в водорослях, клеточных стенках грибкового мицелия, раковинах моллюсков и ракообразных и т. д., оболочки которых содержат 20–30 % хитина в дополнение к минералам (30–50 %), белкам (20–40 %) и липидам (0–14 %) [20]. Обильное употребление в пищу морских организмов является причиной большого количества пищевых отходов с высоким содержанием хитина. Хитин является практически не разлагаемым компонентом пищевых отходов. Распространен химический способ деградации хитина как наиболее быстрый по времени. Его недостатком является экологическая вредность, т. к. в процессе используются кислоты, щелочи и непригодные к дальнейшему использованию побочные продукты [21].

Растительные масла также являются трудноудаляемым компонентом отходов. Масла часто сбрасываются в канализационную систему, что увеличивает расходы очистных станций на их удаление [22]. Богатые липидами отходы препятствуют очистке сточных воды по нескольким причинам. Во-первых, из-за накопления жирных кислот происходит процесс пенообразования. Во-вторых, из-за адсорбации липидов на биомассе происходит флотация осадка и проблемы массообмена. В-третьих, длинноцепочечные жирные кислоты вызывают ингибирование микробных сообществ.

Сточные воды бумажной промышленности имеют высокое содержание целлюлозы и гемицеллюлозы – веществ, которые не могут быть эффективно удалены традиционными видами очистки сточных вод [23]. Также в сточных водах могут содержаться токсичные углеводороды, которые трудно поддаются разложению.

Для загрязнений подобного рода анаэробные условия являются предпочтительными и эффективными. Поэтому технология микробного топливного элемента может внести вклад в очистку сточных вод от углеводородов [24].

Целью исследования являлось изучение способности экстремофильных микроорганизмов, выделенных из термального источника Абаканский Аржан, к гидролизу и окислению трудноразлагаемых субстратов, а также подбор параметров их культивирования.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись изоляты экстремофильных микроорганизмов родов *Geobacter*, *Thermomonas* и *Rhodopseudomonas*, выделенные в рамках предыдущих исследований по изучению микробного сообщества образцов воды и ила термального источника Абаканский Аржан (Россия, Республика Хакасия, Таштыпский район, 51°47›53.9» N 88°15›01.1»E) [25]. Схема отбора образцов представлена в таблице 1.

Образцы воды и ила собирали в августе – сентябре 2020 г. Объем проб воды составил 25 мл, масса проб ила – 25 г. Образцы хранили при 4,0 ± 0,5 °C в стерильных контейнерах.

Накопительные культуры получали путем приготовления 10 % суспензии образцов и ее посева на минимальные питательные среды. Донором электронов в минимальной питательной среде являлся 10 мМ ацетат, акцептором электронов – 40 мМ фумарат. Морфологию микроорганизмов, наличие пилей и чехла определяли микрокопированием с помощью электронного микроскопа (Carl Zeiss, Германия). Использовали люминесцентную микроскопию при помощи инверсионого микроскопа AxioVert.A1 (Carl Zeiss, Германия) с применением красителя акридинового оранжевого.

Для выявления термотолерантных и экстремофильных изолятов чашки Петри инкубировали при температуре 30–60 °C с шагом 5 °C. Оптимум pH для изолятов определяли по методике измерения удельной скорости роста изолята.

Метагеномный анализ выделенных микроорганизмов проводили путем экстрагирования нуклеиновых кислот с использованием наборов DNEasy PowerSoil Kit и RNeasy PowerSoil Total RNA Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколам производителя. Качество выделенных нуклеиновых кислот и оценку целостности РНК определяли на системе капиллярного электрофореза с автосемплером на 8 образцов Qsep1 (Bioptic, Тайвань).

Амплификацию выделенных фрагментов проводили прямым методом по протоколу, описанному G. Muyizer с коллегами [26]. Амплификация 16S РНК проводилась с использованием праймеров 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) и 1525R (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC) [27, 28].

Полимеразно цепную реакцию проводили на амплификаторе АНК-32 (Синтол, Россия) в режиме реального времени при следующих условиях: цикл при 94 °C для денатурации двуцепочечной молекулы ДНК продолжительностью 5 мин, затем 30 циклов при 95 °C в течение 0,5 мин, 55 °C в течение 0,5 мин, 72 °C в течение 1,5 мин, заключительный этап удлинения при 72 °C в течение 10 мин. Рестрикцию проводили с помощью ферментов HaeIII, HhaI, MnlI, Sau3AI и TaqI.

Секвенирование нуклеотидных последовательностей проводили на платформе MiSeq (Illumina, США) с применением NGS технологий. Для работы использовали готовый набор реагентов от производителя Reagent Kit v3 (Illumina, США). Работу вели по протоколам прибора с незначительными модификациями.

Биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей 16S рРНК проводили по базе данных NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov), используя алгоритм BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov).

Для анализа 16S РНК микробиотического сообщества использовали библиотеку Silva (https:// www.arb-silva.de), где представлены комплексные и проверенные на качество и регулярно обновляемые наборы данных выровненных последовательностей малых (16S/18S, SSU) и больших субъединиц (23S/28S, LSU) рибосомных РНК (рРНК) для трех доменов: бактерии, археи и эукариоты [29]. Филогенетический анализ проводили с использованием программы MEGA11 (https://www. megasoftware.net).

Исследование кератинолитической активности вышеупомянутых изолятов осуществляли по ГОСТ Р 55987-2014.

Определение хитинолитической активности экстремофильных микроорганизмов проводилось путем

Таблица 1. Схема отбора проб из источника Абаканский Аржан

Table 1. Sampling scheme, Abakan Arzhan hot srings

Тип образца	Объем/масса	Глубина отбора (для ила от уровня донных отложений), см	pH	Температура, °C
Вода	25 мл	30	6,8	26,5
Вода	25 мл	100	6,9	37,8
Вода	25 мл	300	7,2	40,0
Ил	25 г	10	7,1	25,5
Ил	25 г	20	7,2	30,0
Ил	25 г	30	7,5	31,7

посева бактериальной суспензии уколом на чашки Петри со средой, содержащей в своем составе хитин. Состав питательной среды, г/л: KH_2PO_4 – 1,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,3; $CaCl_2$ – 0,2; пептон – 4,0; дрожжевой экстракт – 4,0; коллоидный хитин – 6,0; агар – 18,0; pH среды 6–6,5. Чашки Петри инкубировали при температуре 37 °C в течение 24 ч. По прошествии указанного времени отмечали проявление зон лизиса и осветление питательной среды в месте ввода бактериальной суспензии. Наличие зон лизиса свидетельствовало о хитинолитической активности изолятов экстремофильных микроорганизмов.

Для оценки способности изолятов к гидролизу липидов использовали метод, основанный на выращивании микроорганизмов в бульоне Штерна. Бульон Штерна содержит растительные масла в качестве единственного источника углерода, необходимого для роста изолятов. Концентрация масла составляла 1 %. В случае положительного результата изоляты будут окислять среду в ходе процесса гидролиза и выработки альдегидов. В ходе эксперимента в стерильные 10 мл пробирки вносили 100 мкл суспензии исследуемого изолята, инкубировали при 37 °C в течение 120 ч. По прошествии отведенного времени отмечали изменение pH среды. Контролем служил стерильный бульон Штерна.

Оценку способности изолятов экстремофильных микроорганизмов к гидролизу ксилана проводили путем изучения скорости образования восстанавливающих сахаров. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для деструкции ксилана с образованием 1 мкмоль восстанавливающих сахаров за единицу времени (1 мин) при температуре 50 °C. Эксперимент проводили на водяной бане ПЭ-4310 (ЭКРОС, Россия) при pH 5,0 [30].

Целлюлазную активность изолятов измеряли согласно стандартной методике IUPAC [31]. Каталазную активность (способность к гидролизу углеводородов) оценивали на средах, где в качестве единственного источника углеводородов был 1 % бензин. Активность определяли газометрическим способом (по А. Ш. Галстяну) [32]. Контролем служили стерильные среды.

Для проведения электрохимических исследований составили консорциумы изолятов Абаканского Аржана *Geobacter*:*Thermomonas*:*Rhodopseudomonas* в различных соотношениях:

– культура № 1 – 1:1:1;
– культура № 2 – 1:2:1;
– культура № 3 – 1:1:2;
– культура № 4 – 2:1:1;
– культура № 5 – 2:1:2.

В качестве прототипа однокамерного безмембранного микробного топливного элемента использовали пластиковую камеру вместимостью 1 л. В данной камере осуществлялся ряд исследований по подбору оптимальных условий культивирования консорциумов.

Для подбора оптимального значения pH в камеру заливали 750 мл мясо-пептонного бульона, вносили суспензии консорциумов (1 % от объема питательной среды) и культивировали при 25 °C в течение 24 ч. Показатели pH варьировали с помощью лимонной кислоты концентрации 1 М и раствора NaOH той же концентрации. По прошествии указанного времени проводили измерение генерируемого консорциумами напряжения с помощью мультиметра DT-832 (TEK, Швейцария).

Для подбора оптимального значения температуры в камеру заливали 750 мл среды мясо-пептонного бульона с подобранным ранее значением pH, вносили консорциумы в количестве 1 % от объема среды и ставили в термостат при температурах 20, 25, 30, 37, 40, 45 и 50 °C. Через 24 ч проводили измерение сгенерированного напряжения.

Для определения оптимальной продолжительности культивирования консорциумы вносили в камеру с 750 мл мясо-пептонного бульона (в объеме 1 % от количества питательной среды) с оптимальным значением pH и температуры, затем ставили в термостат. Измерение напряжения осуществляли через 18, 24, 36, 48 и 72 ч. Все измерения генерируемого напряжения проводились в режиме разомкнутой электрической цепи.

Все исследования проводились в 3-кратной повторности. Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам с использованием программного пакета Microsoft Excel 2010 для Windows 7. Для полученных данных рассчитали среднее значение и стандартное отклонение.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования кератинолитической активности изолятов представлены в таблице 2.

При оценке кератинолитической активности изолятов *Geobacter*, *Thermomonas* и *Rhodopseudomonas*

Таблица 2. Кератинолитическая активность изолятов термального источника Абаканский Аржан

Table 2. Keratinolytic activity of isolates from Abakan Arzhan hot springs

Изолят	Кератинолитическая активность, Е/мг белка	Концентрация биомассы, КОЕ/г·дм^3	Степень гидролиза кератина, %
Geobacter	38,1 ± 0,6	387,0 ± 10,2	72,1 ± 3,0
Thermomonas	36,0 ± 1,8	370,4 ± 22,1	80,1 ± 1,5
Rhodopseudomonas	37,7 ± 1,7	451,3 ± 25,6	79,4 ± 0,9

установлено, что каждый образец проявляет активность в отношении кератиназ: 38,1 ± 0,6, 36,0 ± 1,8 и 37,7 ± 1,7 Е/мг белка соответственно. Максимальную активность показал изолят *Geobacter*. Однако для изолята *Thermomonas* отмечена максимальная степень гидролиза белка – 80,1 ± 1,5 %. Не наблюдалось прямой зависимости между кератинолитической активностью, концентрацией биомассы и степенью гидролиза кератина. На кератинолитическую активность бактерий влияет продолжительность культивирования, но более долгий период может негативно сказаться на ферментативной активности из-за возрастающего значения pH, вызванного реакциями дезаминирования в продуктах гидролиза субстратов [33].

На основании диаметров зон лизиса питательной среды, содержащей в составе гидролизованный хитин, исследовали хитинолитическую активность изолятов *Geobacter*, *Thermomonas и Rhodopseudomonas*. Наибольшей хитинолитической активностью обладают изоляты родов *Geobacter* и *Rhodopseudomonas*. Зона лизиса данных экстремофильных микроорганизмов составила 3,10 ± 0,01 и 3,20 ± 0,01 мм соответственно, изолята *Thermomonas* – 2,40 ± 0,01 мм. Бактерии, продуцирующие хитиназу, могут использоваться в микробных топливных элементах в качестве продуцентов биотоплива. Например, биоводорода [34]. Газообразный водород в качествеформы энергии выделяется при обработке хитинсодержащих отходов бактерией *Clostridium paraputrificum* M-21 [35].

На рисунке 1 представлены результаты оценки липолитической активности изолятов экстремофильных микроорганизмов.

Все изоляты термального источника Абаканский Аржан снижают кислотность среды с течением времени. Изолят *Geobacter* снижает pH с 5,5 до 3,0, *Thermomonas* – с 5,7 до 2,5, *Rhodopseudomonas* – с 5,5 до 3,5. Из рисунка 1 видно, что максимальной активностью в отношении липидов обладают изоляты родов *Geobacter* и *Thermomonas*. Снижение pH среды происходит за счет расщепления растительных масел, входящих в состав бульона Штерна, биомассы исследуемых изолятов термального источника и образования жирных кислот и альдегидов [36]. В процессе культивирования микроорганизмов наблюдалось изменение цвета питательной среды, т. к. в ее составе присутствует краситель фуксин.

На рисунках 2 и 3 представлены результаты исследования гидролиза ксилана и целлюлозы.

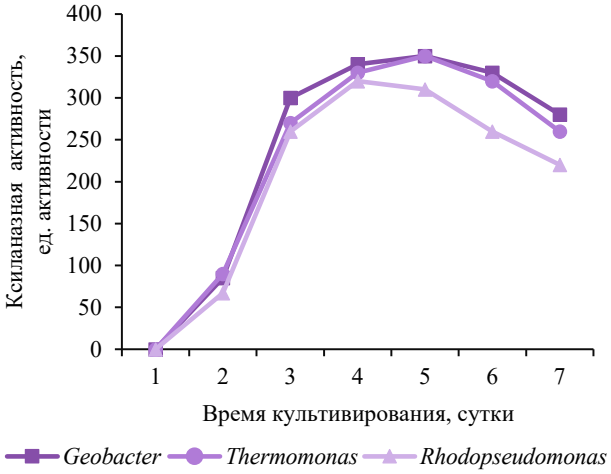

Рисунок 2. Ксиланазная активность изолятов *Geobacter*, *Thermomonas* и *Rhodopseudomonas*

Figure 2. Xylanase activity of *Geobacter*, *Thermomonas*, and *Rhodopseudomonas* isolates

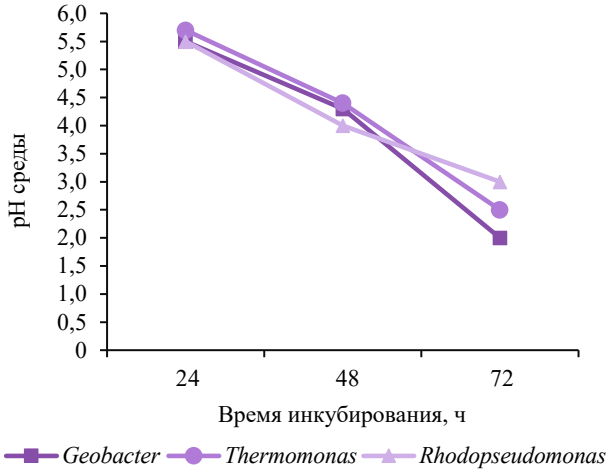

Рисунок 1. Липолитическая активность изолятов *Geobacter*, *Thermomonas* и *Rhodopseudomonas*

Figure 1. Lipolytic activity of *Geobacter*, *Thermomonas*, and *Rhodopseudomonas* isolates

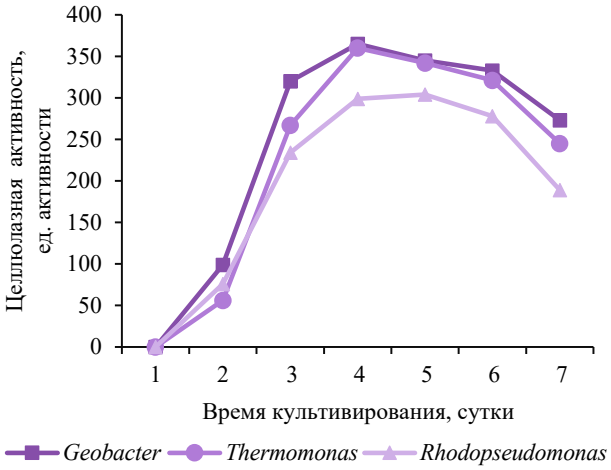

Рисунок 3. Целлюлазная активность изолятов *Geobacter*, *Thermomonas* и *Rhodopseudomonas*

Figure 3. Cellulase activity of *Geobacter*, *Thermomonas*, and *Rhodopseudomonas* isolates

На основании данных их рисунков 2 и 3 можно сделать вывод о том, что изоляты достигают максимальных значений ферментативной активности на 4 сутки культивирования. Изолят *Geobacter* – 350 ед. ксиланазной активности и 365 ед. целлюлазной активности; *Thermomonas* – 350 ед. ксиланазной активности и 360 ед. целлюлазной активности; *Rhodopseudomonas* – 310 ед. ксиланазной активности и 304 ед. целлюлазной активности. Ксиланазная активность становилась выше в среднем на 41 %, целлюлазная – на 35 %. Это происходит из-за доступности растворенных веществ и их проникновения в клетки изолятов термального источника Абаканский Аржан, что обеспечивает их питательными веществами и факторами роста.

В таблице 3 представлены результаты определения восстанавливающих сахаров в экспериментах изучения ксиланазной и целлюлазной активностей изолятов *Geobacter*, *Thermomonas* и *Rhodopseudomonas.*

Как видно из таблицы 3, количество редуцирующих сахаров снижалось в течение 7 суток и достигло минимального значения на 7 сутки наблюдений.

Данные таблицы 4 демонстрируют результаты исследования каталазной активности изолятов на питательных средах, содержащих в качестве источника углерода бензин.

На основе данных из таблицы 4 можно сделать вывод о том, что наибольшей каталазной активностью обладают изоляты *Geobacter* и *Thermomonas.*

На рисунке 4 приведены результаты исследования по подбору оптимальных параметров культивирования консорциумов изолятов Абаканского Аржана.

Таблица 3. Восстанавливающие сахара в экспериментах по определению ксиланазной и целлюлазной активностей изолятов *Geobacter*, *Thermomonas* и *Rhodopseudomonas*

Table 3. Reducing sugars in xylanase and cellulase experiments: *Geobacter*, *Thermomonas*, and *Rhodopseudomonas* isolates

Сутки	*Geobacter*	*Thermomonas*	*Rhodopseudomonas*
1	6,6 ± 0,3	6,6 ± 0,3	6,5 ± 0,2
2	6,2 ± 0,2	6,5 ± 0,1	6,5 ± 0,5
3	6,0 ± 0,4	6,0 ± 0,5	6,3 ± 0,6
4	5,4 ± 0,6	5,5 ± 0,2	5,8 ± 0,3
5	4,4 ± 0,3	4,5 ± 0,2	5,5 ± 0,1
6	3,2 ± 0,8	3,8 ± 0,4	4,5 ± 0,4
7	2,1 ± 0,1	2,5 ± 0,1	3,1 ± 0,2

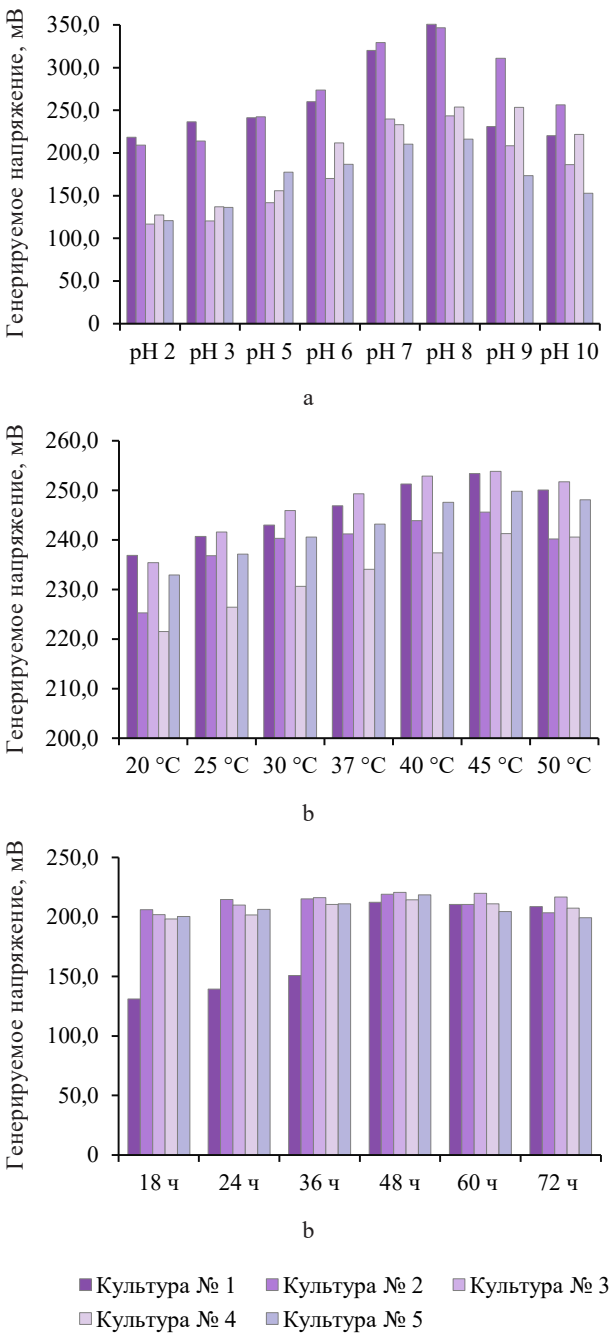

Рисунок 4. Рабочие параметры совместного культивирования изолятов: a) pH среды; b) температура культивирования; c) время культивирования

Figure 4. Variables for consortium cultivation: a) pH; b) temperature; c) cultivation time

Таблица 4. Каталазная активность изолятов *Geobacter*, *Thermomonas* и *Rhodopseudomonas*

Table 4. Catalase activity of *Geobacter*, *Thermomonas*, and *Rhodopseudomonas* isolates

Время культивирования, ч	*Geobacter*	*Thermomonas*	*Rhodopseudomonas*
0	1,40 ± 0,90	1,38 ± 0,50	1,23 ± 0,50
14	1,21 ± 1,10	1,27 ± 0,50	1,03 ± 0,30
28	0,93 ± 0,20	0,87 ± 0,10	0,87 ± 0,40
42	0,74 ± 0,10	0,65 ± 0,10	0,64 ± 0,30

Согласно результатам из рисунка 4 оптимальными параметрами культивирования изолятов являются: pH среды 8 (изоляты демонстрировали максимальное генерирование энергии в сравнении с другими значениями (от 216,2 до 350,7 мВ)); температура культивирования 45 °C (генерирование напряжения изолятами составило от 241,3 до 253,4 мВ); продолжительность культивирования 48 ч (генерирование напряжения составило от 212,3 до 220,6 мВ).

Выводы

Сточные воды различных отраслей промышленности бывают загрязнены различными отходами. Нередко в их состав входят трудноразлагаемые компоненты, удаление которых требует больших затрат и энергии. К таким компонентам относят кератин, хитин, липиды, ксилан, целлюлозу и углеводороды. Заменой химическим методам очистки может стать биологический. Технология микробного топливного элемента, в которой предусматривается использование биомассы экстремофильных микроорганизмов, позволяет решить две проблемы: эффективно очищать сточные воды одновременно с накоплением экологически чистой энергии.

В ходе работы достигнуты следующие результаты:

1. Провели анализ кератинолитической активности изолятов *Geobacter*, *Thermomonas* и *Rhodopseudomonas*. Каждый образец проявляет активность в отношении кератиназ: 38,1 ± 0,6, 36,0 ± 1,8 и 37,7 ± 1,7 Е/мг белка соответственно. Максимальную активность показал изолят *Geobacter*, но для изолята *Thermomonas* отмечена максимальная степень гидролиза белка – 80,1 ± 1,5 %;

2. Провели анализ хитинолитической активности изолятов *Geobacter*, *Thermomonas* и *Rhodopseudomonas*. Изоляты родов *Geobacter* и *Rhodopseudomonas* проявляют большую литическую активность в отношении хитина: зоны лизиса на хитинсодержащей среде 3,10 ± 0,01 и 3,20 ± 0,01 мм соответственно;

3. Провели оценку липолитической активности изолятов *Geobacter*, *Thermomonas* и *Rhodopseudomonas*. Все изоляты снижают кислотность среды с течением времени: *Geobacter* с 5,5 до 3; *Thermomonas* с 5,7 до 2,5; *Rhodopseudomonas* с 5,5 до 3. Максимальной активностью в отношении липидов обладают изоляты *Geobacter* и *Thermomonas*;

4. Исследовали динамику изменения ксиланазной и целлюлазной активностей изолятов *Geobacter*, *Thermomonas* и *Rhodopseudomonas*. Максимальных значений все изоляты достигают на 4 сутки культивирования: *Geobacter* – 350 ед. ксиланазной активности и 365 ед. целлюлазной активности; *Thermomonas* – 350 ед. ксиланазной активности и 360 ед. целлюлазной активности; *Rhodopseudomonas* – 310 ед. ксиланазной активности и 304 ед. целлюлазной активности. Ксиланазная активность была выше в среднем на 41 %, целлюлазная – на 35 %;

5. Исследовали каталазную активность изолятов. Изоляты *Geobacter* и *Thermomonas* отличаются максимальной каталазной активностью – 1,40 и 1,38 ед. активности соответственно;

6. Установили оптимальные параметры культивирования консорциумов изолятов Абаканского Аржана по количеству генерируемого напряжения. Максимальное напряжение консорциумы изолятов *Geobacter*, *Thermomonas* и *Rhodopseudomonas* генерировали при pH среды 8, температуре 45 °C и продолжительности культивирования 48 ч. При данных параметрах зафиксировано наибольшее генерирование напряжения.

Таким образом, изоляты родов *Geobacter*, *Thermomonas* и *Rhodopseudomonas*, выделенные из термального источника Абаканский Аржан, способны применяться в создании безотходных производств путем очистки окружающей среды и в генерировании экологически чистой энергии.

Критерии авторства

Все авторы в равной степени несут ответственность за полученные результаты исследований и рукопись.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

The authors were equally involved in writing the manuscript and are equally responsible for plagiarism.

Conflict of interest

The authors declared no conflict of interests regarding the publication of this article.

References

1. Owusu PA, Asumadu-Sarkodie S. A review of renewable energy sources, sustainability issues and climate change mitigation. Cogent Engineering. 2016;3. https://doi.org/10.6084/M9.FIGSHARE.3381454

2. Halkos GE, Gkampoura E-C. Reviewing usage, potentials, and limitations of renewable energy sources. Energies. 2020;13(11). https://doi.org/10.3390/en13112906

3. Elhenawy S, Khraisheh M, AlMomani F, Al-Ghouti M, Hassan MK. From waste to watts: Updates on key applications of microbial fuel cells in wastewater treatment and energy production. Sustainability. 2022;14(2). https://doi.org/10.3390/su14020955

4. Kurniawan TA, Othman MHD, Singh D, Avtar R, Goh HH, Setiadi T, *et al.* Technological solutions for long-term management of partially used nuclear fuel: A critical review. Annals of Nuclear Energy. 2022;166. https://doi.org/10.1016/j.anucene.2021.108736

5. Ivanova S, Vesnina A, Fotina N, Prosekov A. An overview of carbon footprint of coal mining to curtail greenhouse gas emissions. Sustainability. 2022;14(22). https://doi.org/10.3390/su142215135

6. Levitan O, Dinamarca J, Hochman G, Falkowski PG. Diatoms: A fossil fuel of the future. Trends in Biotechnology. 2014;32(3):117–124. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.01.004

7. Guo Y, Wang J, Shinde S, Wang X, Li Y, Dai Y, *et al.* Simultaneous wastewater treatment and energy harvesting in microbial fuel cells: An update on the biocatalysts. RSC Advances. 2020;10:25874–25887. https://doi.org/10.1039/D0RA05234E

8. Din MI, Nabi AG, Hussain Z, Khalid R, Iqbal M, Arshad M, *et al.* Microbial fuel cells – A preferred technology to prevail energy crisis. International Journal of Energy Research. 2021;45(6):8370–8388. https://doi.org/10.1002/er.6403

9. He L, Du P, Chen Y, Lu H, Cheng X, Chang B, *et al.* Advances in microbial fuel cells for wastewater treatment. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2017;71:388–403. https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.069

10. Chettri D, Verma AK, Sarkar L, Verma AK. Role of extremophiles and their extremozymes in biorefinery process of lignocellulose degradation. Extremophiles. 2021;25:203–219. https://doi.org/10.1007/s00792-021-01225-0

11. Faskhutdinova ER, Fotina NV, Neverova OA, Golubtsova YuV, Mudgal G, Asyakina LK, *et al.* Extremophilic bacteria as biofertilizer for agricultural wheat. Foods and Raw Materials. 2024;12(2):348–360. https://doi.org/10.21603/2308-4057-2024-2-613

12. Gallo G, Puopolo R, Carbonaro M, Maresca E, Fiorentino G. Extremophiles, a nifty tool to face environmental pollution: From exploitation of metabolism to genome engineering. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2021;18(10). https://doi.org/10.3390/ijerph18105228

13. Breheny M, Bowman K, Farahmand N, Gomaa O, Keshavarz T, Kyazze G. Biocatalytic electrode improvement strategies in microbial fuel cell systems. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2019;94(7):2081–2091. https://doi.org/10.1002/jctb.5916

14. Pandit S, Savla N, Sonawane JM, Sani AM, Gupta PK, Mathuriya AS, *et al.* Agricultural waste and wastewater as feedstock for bioelectricity generation using microbial fuel cells: Recent advances. Fermentation. 2021;7(3). https://doi.org/10.3390/fermentation7030169

15. Shestakova A, Timorshina S, Osmolovskiy A. Biodegradation of keratin-rich husbandry waste as a path to sustainable agriculture. Sustainability. 2021;13(16). https://doi.org/10.3390/su13168691

16. Stingone JA, Wing S. Poultry litter incineration as a source of energy: Reviewing the potential impacts on environmental health and justice. New Solutions: A Journal of Environmental and Occupational Health Policy. 2011;21(1):27–42. https://doi.org/10.2190/NS.21.1.g

17. Tesfaye T, Sithole B, Ramjugernath D. Valorisation of chicken feathers: a review on recycling and recovery route – current status and future prospects. Clean Technologies and Environmental Policy. 2017;19:2363–2378. https://doi.org/10.1007/s10098-017-1443-9

18. Pahua-Ramos ME, Hernández-Melchor DJ, Camacho-Pérez B, Quezada-Cruz M. Degradation of chicken feathers: A review. BioTechnology: An Indian Journal. 2017;13(6):1–24.

19. Gasmi M, Kitouni M, Carro L, Pujic P, Normand P, Boubakri H. Chitinolytic actinobacteria isolated from an Algerian semi-arid soil: Development of an antifungal chitinase-dependent assay and GH18 chitinase gene identification. Annals of Microbiology. 2019;69:395–405. https://doi.org/10.1007/s13213-018-1426-z

20. Borić M, Puliyalil H, Novak U, Likozar B. An intensified atmospheric plasma-based process for the isolation of the chitin biopolymer from waste crustacean biomass. Green Chemistry. 2018;20:1199–1204. https://doi.org/10.1039/c7gc03735j

21. Sharma S, Kaur N, Kaur R, Ramande K. A review on valorization of chitinous waste. Journal of Polymer Research. 2021;28. https://doi.org/10.1007/s10965-021-02759-9

22. Lopes M, Miranda SM, Alves JM, Pereira AS, Belo I. Waste cooking oils as feedstock for lipase and lipid-rich biomass production. European Journal of Lipid Science and Technology. 2019;121(1). https://doi.org/10.1002/ejlt.201800188

23. Kumar R, Singh L, Zularisam AW, Hai FI. Microbial fuel cell is emerging as a versatile technology: A review on its possible applications, challenges and strategies to improve the performances. International Journal of Energy Research. 2018;42(2):369–394. https://doi.org/10.1002/er.3780

24. Mukherjee A, Patel R, Zaveri P, Shah MT, Munshi NS. Microbial fuel cell performance for aromatic hydrocarbon bioremediation and common effluent treatment plant wastewater treatment with bioelectricity generation through series-parallel connection. Letters in Applied Microbiology. 2022;75(4):785–795. https://doi.org/10.1111/lam.13612

25. Dmitrieva AI, Faskhutdinova ER, Drozdova MYu, Kutuzov SS, Proskuryakova LA. Phylogenetic diversity of microorganisms from the Abakan Arzhan thermal spring: Potential producers of microbial energy. Food Processing: Techniques and Technology. 2022;52(3):458–468. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-3-2384

26. Muyizer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology. 1993;59(3):695–700. https://doi.org/10.1128/aem.59.3.695-700.1993

27. Andreeva A, Budenkova E, Babich O, Sukhikh S, Ulrikh E, Ivanova S, *et al.* Production, purification, and study of the amino acid composition of microalgae proteins. Molecules. 2021;26(9).

28. Prosekov AYu, Babich OO, Bespomestnykh KV. Identification of industrially important lactic acid bacteria in foodstuffs. Foods and Raw Materials. 2013;1(2):42–45. https://doi.org/10.12737/2053

29. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Research. 2013;41(D1):D590–D596. https://doi.org/10.1093/nar/gks1219

30. König J, Grasser R, Pikor H, Vogel K. Determination of xylanase, β-glucanase, and cellulase activity. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2002;374:80–87. https://doi.org/10.1007/s00216-002-1379-7

31. Ghose TK. Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry. 1987;59(2):257–268.

32. Galstyan ASh. Unified methods for studying soil enzymes. Eurasian Soil Science. 1978;(2):107–113. (In Russ.). [Галстян А. Ш. Унификация методов исследования активности ферментов почв // Почвоведение. 1978. № 2. С. 107–113.].

33. Cavello I, Urbieta MS, Cavalitto S, Donati E. *Bacillus cytotoxicus* isolated from a pristine natural geothermal area reveals high keratinolytic activity. Microorganisms. 2020;8(6). https://doi.org/10.3390/microorganisms8060796

34. Dhole NP, Dar MA, Pandit RS. Recent advances in the bioprospection and applications of chitinolytic bacteria for valorization of waste chitin. Archives of Microbiology. 2021;203:1953–1969. https://doi.org/10.1007/s00203-021-02234-5

35. Evvyernie D, Morimoto K, Karita S, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K. Conversion of chitinous wastes to hydrogen gas by *Clostridium paraputrificum* M-21. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2001;91(4):339–343. https://doi.org/10.1016/s1389-1723(01)80148-1

36. Kolotova OV, Sokolova IV, Vladimtseva IV, Belen′kova TV, Shevtsova VS. Isolation and study of lipid-oxidizing microorganisms from the northen Caspian Sea. Bulletin of the Technological University. 2017;20(6):135–138. (In Russ.). [Выделение и изучение липидоокисляющих микроорганизмов – обитателей северного Каспия / О. В. Колотова [и др.] // Вестник Технологического Университета. 2017. Т. 20. № 6. С. 135–138.]. https://elibrary.ru/YIXKJP