

ГИДРОЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТАРКТИЧЕСКИХ БАЦИЛЛ

*Из почв Антарктиды выделены штаммы бактерий, которые после идентификации были отнесены к роду *Bacillus*. Изучена возможность выделенных бацилл расщеплять различные природные субстраты. Показано, что антарктические штаммы бацилл способны продуцировать комплексы гидролитических ферментов – целлюлаз, ксиланаз, пектиназ и липаз.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: Антарктида, бактерии рода *Bacillus*, гидролитические ферменты.

Спорообразующие бактерии рода *Bacillus* часто обнаруживают в регионах Антарктики, мало изученной и наиболее суровой области земного шара [11, 13]. Представители рода *Bacillus* [1, 3] относятся к наиболее активным продуцентам гидролитических ферментов.

Такие ферменты, как целлюлазы, ксиланазы и другие, участвующие в разложении растительной клеточной стенки, занимают центральное место в круговороте органического углерода и демонстрируют поразительное разнообразие форм, создаваемых различными микроорганизмами.

Сегодня по-прежнему актуален поиск штаммов микроорганизмов, продуцирующих и в суровых условиях различные гидролитические ферменты, благодаря которым становится доступным сложное органическое вещество, состоящее из целлюлозы, пектинов, гемицеллюлоз, белков и жиров. Не исключено, что такая специфическая среда обитания микроорганизмов как Антарктика могла способствовать появлению штаммов бактерий с особыми свойствами [3].

Целью настоящей работы было выявление способности штаммов бацилл, выделенных и идентифицированных из антарктических проб, расщеплять целлюлозосодержащие субстраты, ксилан, пектин, а также оливковое масло и твины для отбора среди них новых продуцентов гидролитических ферментов.

Материалы и методы

Микроорганизмы выделяли из образцов почвы и мха, которые были отобраны на острове Галиндез (Антарктида) в ходе Украинской экспедиции 2002 года.

Идентификацию полученных изолятов проводили по культурально-морфологическим и физиолого-биологическим свойствам [15].

Выделение ДНК проводили согласно методу [7]. ПЦР осуществляли с использованием термального циклера Hybaid PCR Express и праймеров 16S Forward

(AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) и 16S Reverse (TACGGYTACCTTGTTACGACTT). Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1,5% агарозе Genaxis. Сиквенс осуществляли на сиквенаторе CEQ™ 2000XL (Beckman Coulter). Анализ полученных данных и сравнение с последовательностями Gen Bank проводили с помощью компьютерной программы BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Для исследования ферментативной активности штаммов бактериальные культуры выращивали в колбах в условиях аэрации на качалке (200 об/мин) при 37 °С в течение двух суток на жидкой синтетической среде (г/л): натрия цитрат — 1,29, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — 4,75, KH_2PO_4 — 9,6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,18 с добавлением соответствующих специфических субстратов — Na-КМЦ (натрий карбоксиметилцеллюлозы), целлобиозы, пектина, оливкового масла и твинов 20, 40, 60 и 80. Ферментативную активность определяли в бесклеточной культуральной жидкости после центрифугирования при 6000 об/мин в течение 20 мин. Об активности продуцируемых бактериями ферментов судили по образованию зон просветления соответствующего субстрата на агаризованных средах. Количественное определение эндоглюканазной активности проводили по количеству образовавшихся редуцирующих сахаров после гидролиза 1%-ной Na-КМЦ, определяемых по реакции с динитросалициловой кислотой [10]. Целлобиазную (β -глюкозидазную) активность аналогично при действии на 0,2% раствор целлобиозы [8].

Активность ксиланазы определяли по количеству образовавшихся сахаров (ксилозы) при гидролизе 1% ксилана овса титрованием [10]. Полигалактуроназу (ПГ) и пектинэстеразу (ПЭ) — титрометрическим методом по количеству альдегидных и метоксильных групп, образующихся при расщеплении 0,5% пектина соответственно и рассчитывали по формулам, приведенным в методиках [5]. Ферментативную активность бактерий выражали в ед/мл культуральной жидкости.

Оценку липазной активности бактерий проводили по модифицированному методу Ота и Ямады и выражали в микромолях олеиновой кислоты, освобождающейся в результате гидролиза субстрата (40% эмульсии оливкового масла в 2% водном растворе поливинилового спирта) [14].

Опыты проводили не менее, чем в 3-х повторностях. Результаты статистически обрабатывали, используя компьютерную программу Microsoft Excel 97.

Результаты и их обсуждение

Из антарктических проб выделено и идентифицировано методами фенотипического анализа и генотипического тестирования 13 штаммов бактерий рода *Bacillus* (табл. 1). В результате изучения изолятов было выявлено два штамма *B. licheniformis* и 9 штаммов *B. subtilis*.

Между данными сиквенса генов 16S rRNA и результатами изучения физиолого-биохимических характеристик шести штаммов бацилл показана корреляция. Штаммы A_7 и A_9 были идентифицированы по фенотипическим признакам как *B. silvestris*, однако эти данные противоречат показателям сиквенса гена 16S rRNA. Исследования относительно определения таксономического статуса штаммов A_7 и A_9 в дальнейшем будут продолжены.

В последующих исследованиях была изучена способность выделенных штаммов к синтезу гидролитических ферментов.



Результаты сиквенса фрагментов гена 16S rRNA изолированных штаммов спорообразующих бактерий

Results of 16S rRNA gene sequence of sporeforming bacteria isolated from Antarctic samples

Штамм	Название вида в Gen Bank	Подобие с генами 16S rRNA референтных штаммов, %	Количество нуклеотидов идентичного фрагмента гена 16S rRNA
A ₉	Low G+C Gram-positive bacterium M32	98	675
	<i>Bacillaceae bacterium</i> LA38BB	98	669
	<i>Kurthia gibsonii</i> NCIMB 9758	97	626
	<i>Kurthia sibirica</i> DSM 4747T	96	652
A ₇	<i>Bacillaceae bacterium</i> LA38BB	98	595
	Low G+C Gram-positive bacterium M32	98	594
	<i>Kurthia sibirica</i> ATCC 49154	94	542
A ₄	<i>Bacillus subtilis</i> strain KL-077	98	642
	<i>Bacillus subtilis</i> strain KL-073	98	642
A ₈	<i>Bacillus subtilis</i> strain STB29	98	503
	<i>Bacillus subtilis</i> strain KL-077	98	503
A _{23/2}	<i>Bacillus subtilis</i> strain BHP6-1	99	575
	<i>Bacillus subtilis</i> strain HAZ14	99	575
A _{6/2}	<i>Bacillus licheniformis</i> strain KL-185	99	558
	<i>Bacillus licheniformis</i> strain PR-1	99	558
A _{6/3}	<i>Bacillus licheniformis</i> strain KL-185	97	500
	<i>Bacillus licheniformis</i> strain KL-176	97	500
A _{5/3}	<i>Bacillus subtilis</i> strain WP1-21	97	501
	<i>Bacillus subtilis</i> strain BZ15	97	501

Установлено, что изучаемые антарктические бациллы способны синтезировать ряд экстрацеллюлярных ферментов, в частности ферменты целлюлазного и ксилазного комплексов, а также липолитические и пектолитические ферменты (табл. 2).

Способностью образовывать КМЦ-азу (эндоглюканазу) обладали все исследуемые культуры антарктических бацилл. Штаммы *B. subtilis* A₂, A₄ и A_{23/1} образовывали желтые зоны диаметром 3–11 мм на грязно-красном фоне. У штаммов *B. subtilis* A₅, A₈ и A₁₃ и штаммов других видов вокруг выросших колоний через 5–6 часов после проявления желтых зон в центре появлялась также и синяя окраска диаметром 12–13 мм. Исходя из этого, можно предположить, что эти культуры синтезируют разные типы целлюлаз. Такая способность описана и для

других продуцентов целлюлаз [2, 4, 8]. Некоторые авторы проявление желтых зон при расщеплении целлюлозы связывают с образованием глюкозы, синих зон — с образованием целлобиозы, пентоз или целлоолигосахаридов, а также с условиями их культивирования [8, 14].

Наибольшей целлюлозолитической активностью отличались штаммы *B. subtilis* A_{5/2} (18680 ед/мл), A_{5/1} (10428 ед/мл), *B. licheniformis* A_{6/2} — (11660 ед/мл) и *Bacillus spp.* A₁₀ (10480 ед/мл). Штаммы *B. subtilis* и *Bacillus spp.* (A₁₃, A₂, A₄, A₅, A₈, A_{5/3}) синтезировали целлюлазы активностью в пределах 5820—6012 ед/мл, штаммы бактерий *B. licheniformis* A_{6/2}, *B. silvestris*, *B. subtilis* A_{23/2} и A_{23/1} продуцировали этот фермент в количестве 3753 ед/мл. Целлобиазная активность исследуемых культур находилась на одном уровне — 83—92 ед/мл.

В природных растительных материалах трудно разлагающаяся целлюлоза, как самый распространенный углеводный полимер высших растений и водорослей, связана обычно со многими другими полисахаридными соединениями: гемицеллюлозой, пектином, лигнином. К ферментам, разлагающим эти полимеры, относятся и ксиланазы, как ферменты, необходимые для полной биоконверсии растительного сырья, в частности его ксиланов, которые содержатся в стенках растительных клеток разных видов растений, таких, как древовидные папоротники, хвойные, хлебные злаки.

Полученные нами данные показали, что исследуемые антарктические бациллы обладают способностью расщеплять и ксилан. Ксиланазную активность учитывали по зонам просветления данного субстрата, различающимися как по диаметру (от 15 до 22 мм), так и по окраске (желтые, темные, смешанные), что, вероятно, также связано со способностью изучаемых бактерий к синтезу различных типов ксиланаз (эндо- и экзоксилаза или обеих вместе). Однако, даже наиболее активные среди выявленных нами культур *B. subtilis*, *B. licheniformis* и *B. silvestris* нельзя было отнести к высокоактивным по этому ферменту штаммам (21,8—34,7 ед/мл).

При исследовании антарктических бацилл нами установлено отсутствие у них пектинэстеразы (ПЭ) и наличие только полигалактуроназы (ПГ). Активные по расщеплению пектина культуры бацилл под влиянием пектиназ образовывали разные по внешнему виду зоны гидролиза: прозрачные зоны с бледно-синим ореолом, которые через несколько часов теряли четкость контуров, и четкие зоны с бело-молочным ореолом, сохраняющиеся долгое время. Отличались зоны также по диаметру и проявлялись в разные сроки, что, возможно, является отражением степени активности обнаруживаемых у штаммов различных типов пектиназ. По способности гидролизовать пектин исследуемые штаммы антарктических бацилл располагались в таком порядке (в ед/мл): *B. subtilis* (9 шт.) — 9,65±3,2; *B. licheniformis* (2 шт.) — 8,9±0,2; *B. spp.* (2 шт.) — 8,1±0,5; *B. silvestris* (1 шт.) — 8,6±0,5 (табл. 2).

Полученные нами результаты показали также, что для разных видов антарктических бацилл характерно еще одно важное свойство — способность к гидролизу сложноэфирной связи в молекулах таких субстратов, как оливковое масло и различные синтетические твины. Использование таких различных субстратов позволило выявить существенные видовые и даже штаммовые различия этих микроорганизмов. Так, наиболее активными при гидролизе оливкового масла были штаммы *B. silvestris* A₇ (56,5 ед/мл), *B. subtilis* A₂, A₄, A_{23/1}, A_{5/3}, A_{23/2} (от 45,5 до 52 ед/мл), *Bacillus spp.* A₁₀, A₁₃ (от 32,5 до 40 ед/мл) и штаммы *B. licheniformis* 6/2, 6/3 (26—35,5



Таблица 2

Table 2

Ферментативная активность антарктических бацилл (в ед./мл)

The enzymatic activity of Antarctic bacilli (un/ ml)

Вид	Штамм	Целлюлазный комплекс		Ксиланаза	Пектинолитический комплекс		Оливковое масло	Твин			
		КМЦ-аза	β-глюкозидаза		ПЭ	ПА		20	40	60	80
<i>B. subtilis</i>	A ₂	5820,0	86,0	29,6	0	6,6	52,0	83,5	116,5	94,5	82,0
<i>B. subtilis</i>	A ₄	5850	86,0	21,8	0	8,0	52,0	80,5	112,5	82,5	84,5
<i>B. subtilis</i>	A ₅	5364	83,0	22,8	0	7,2	1,5	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	A ₈	5364	87,5	21,8	0	10,9	9,0	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	A _{5/1}	10428	90,5	21,8	0	11,3	11,5	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	A _{5/2}	18680	81,0	26,6	0	11,1	2,5	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	A _{5/3}	6012	92,0	21,3	0	11,3	45,5	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	A _{23/2}	3753	90,5	21,3	0	7,6	46,0	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	A _{23/1}	3753	86,0	28,6	0	12,9	47,5	-	-	-	-
<i>B. licheniformis</i>	A _{6/2}	3753	84,5	27,6	0	8,7	26,0	-	-	-	-
<i>B. licheniformis</i>	A _{6/3}	11660	87,5	34,7	0	9,1	35,5	-	-	-	-
<i>B. siloestrus</i>	A ₇	3753	86,0	20,3	0	8,6	56,5	101,5	87,5	86,5	88,5
<i>Bacillus spp.</i>	A ₁₀	10480	86,0	10,6	0	8,6	32,5	-	-	-	-
<i>Bacillus spp.</i>	A ₁₃	5526	86,0	12,6	0	7,6	40,0	-	-	-	-

Примечание: “ — ” — не определяли

ед/мл). Низкую активность проявили штаммы *B. subtilis* A₅, A_{5/1}, A₈, A_{5/2} (от 1,5 до 11,5 ед/мл). При использовании твина в качестве субстрата бактерии выявили более высокую степень липазной активности, которая на 57–124% превышала активность гидролиза ими оливкового масла. Такую неоднозначность действия твинов и оливкового масла на липазную активность микроорганизмов некоторые исследователи объясняют различной проницаемостью клеточных мембран под их влиянием и связанным с этим повышенным выходом ферментов в культуральную жидкость, а отсутствие стимулирующего действия оливкового масла, видимо, накоплением в среде в результате его гидролиза олеиновой кислоты, которая ингибирует биосинтез липаз [2, 6, 9].

Наряду с этим твины, будучи введенными в питательную среду, являются лучшим субстратом, чем масла. Эмульгаторами понижают поверхностное натяжение на границе жир-вода, и тогда жир лучше смешивается с водой, образуя эмульсию, более доступную для действия липаз [9, 14]. Такая специфичность проявления активности бактерий нередко определяет их значение при определении природного местообитания в биогеоценозах, ведь одним из путей проникновения микроорганизмов через покровы растений может быть именно ферментативный гидролиз липидов [11].

При анализе этого материала заслуживает внимания именно то, что исследуемые бациллы обладают способностью гидролизовать не только жидкие, но и твердые твины, которые как составные разнообразных жироподобных веществ — восков у растений с восковым налетом, выполняют важную биологическую функцию при регулировании их водного режима и предохранения от неблагоприятных влияний окружающей среды (высыхания, понижения смачивания, поражения микроорганизмами, а также во время покоя или адаптации) [12]. На наш взгляд это немаловажно для Антарктики с ее суровыми условиями.

Таким образом, полученные данные показали, что все выделенные штаммы исследованных антарктических бацилл обладают способностью расщеплять целлюлозу, целлобиозу, ксилан, пектин, оливковое масло и твины и являются активными продуцентами гидролаз, что является свидетельством огромной ферментативной вооруженности этих бактерий и отражает универсальность их жизненной системы, способной использовать самые разные природные субстраты. Показано, что наиболее активно ими расщеплялись целлюлоза и целлобиоза, менее активно ксиланосодержащие субстраты. Установлено также наличие у них полигалактуроназы и отсутствие пектинэстеразы. Выделенным штаммам антарктических бацилл свойственна способность гидролизовать такие субстраты как оливковое масло и синтетические твины.

Полученные данные показывают перспективы потенциального использования исследованных штаммов бактерий в биотехнологии в качестве неисчерпаемого источника полезных продуктов, в том числе целлюлаз, ксиланаз, пектиназ, липаз и других гидролитических ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баросс Д., Морита Р. Жизнь микроорганизмов при низких температурах: экологические аспекты // Жизнь микробов в экстремальных условиях. Под ред. Д. Кашнера. М.: Мир., 1981. — С. 19–82.



2. Безбородов А.М., Астапович Н.И. Секреция ферментов у микроорганизмов. М. : Наука, 1984. — 72 с.
3. Беленева И.А., Масленникова Э.Ф. Гидролитическая активность морских бактерий — ассоциантов мидии *Mytilus trossulus* // Микроб. журн. — 2005.— 67, № 1. — С. 3—7.
4. Билай В.И., Пидопличко Н.М., Тарадий Г.В. Целлюлолитические свойства плесневых грибов и принципы отбора активных продуцентов целлюлаз // Ферментативное расщепление целлюлазы. М.: Наука, 1967.— С. 37—45.
5. Лифшиц Д.Б. Методы определения пектолитической активности препаратов плесневых грибов // Унифицированные методы определения активности ферментных препаратов производственного назначения. — К.: Укр НИИТИ, 1967.— 42 с.
6. Лобырева Г.Б. Липолитическая активность дрожжей *Candida utilis* 295t // Изв. АН СССР, Серия биол. 1974. — № 6. — С. 885—890.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
8. Рабинович М.Л., Черноглазов В.М., Клесов А.А. Классификация целлюлаз их распространенность, множественные формы и механизмы действия целлюлаз // В сб. «Итоги науки и техники» ВИНТИ. Биотехнология, 1988.— Т. 11. — С. 1—224.
9. Рубан Е.Л. Микробные липиды и липазы.— М.: Наука, 1977.— 218 с.
10. Рухлядева А.П., Польшалина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. М.: Легк. и пищ. пром-сть, 1981.— 288 с.
11. Сова В.В., Широкова Н.И., Кусайкина М.И. β -1-3-глюкозидаза из оплодотворенных яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. Сравнение с β -1-3-глюкозидазами морских иноземных моллюсков // Биохимия. 2003. — Т. 68, № 5, — С. 650—655.
12. Bonkowski M., Yrifiiths B.S., Ritz K. Food preference of earthworms for soil fungi // Pedobiologia.— 2000. — 44. — P. 666—676.
13. Fajardo-Cavazos P., Nicholson Wayne Bacillus endospores isolated from granite : Close molecular relationships to globally distributed *Bacillus spp.* from endolithic and extreme environments // Appl. and Environ. Microbiol. — 2006. — 72, № 4. — P. 2856—2863.
14. Ota V., Yamada Y. Lipase from *Candida parapolitytica*. Part 1. Anionic surfactants as the essential activator in the systems emulsified by polyvinyl alcohol // Agric. Biol. Chem. — 1966.— V. 30, № 4. — P. 351—358.
15. Reva O.N., Sorokulova I.B., Smirnov V.V. Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype // Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol. — 2001. — № 51. — P. 1361—1371.

A.I. Osadchaya, L.A. Safronova, A.N. Poltavsky, V.M. Ilyash

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU,
Zabolotny str., 154, Kiev, D 03680, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 24 09
e-mail: safronova_larisa@ukr.net

HYDROLASE ACTIVITY OF ANTARCTIC BACILLI

Summary

Strains of bacteria were isolated from Antarctica soil after identification they were attributed to genus *Bacillus*. The opportunity of participation of isolated bacilli in the degradation of various natural substrates has been studied.

It is supposed that such natural extreme habitat as Antarctic Region is not casual for the investigated bacteria and displays universality of their vital system. It is shown that Antarctic strains of bacteria are capable to produce hydrolytic enzymes complexes — cellulases, xylanases, pectinases and lipases and are the perspective cultures for using in biotechnology.

K e y w o r d s: Antarctica, bacteria of genus *Bacillus*, hydrolytic enzymes.

А.І. Осадча, Л.А. Сафронова, О.М. Полтавський, В.М. Іляш

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, ГСП, Д 03680, Україна, тел.: +38 (044) 526 24 09,
e-mail: safronova_larisa@ukr.net

ГІДРОЛАЗНА АКТИВНІСТЬ АНТАРКТИЧНИХ БАЦИЛ

Реферат

Із ґрунтів Антарктиди виділені штами бактерій, які після ідентифікації були віднесені до роду *Bacillus*. Вивчена можливість виділених бацилл розщиплювати різноманітні природні субстрати.

Припускається, що таке природне екстремальне місцезнаходження як Антарктика є не випадковим для досліджених бактерій і відображає універсальність їх життєвої системи. Показано, що антарктичні штами бактерій здатні продукувати комплекси гідролітичних ферментів — целюлаз, ксиланаз, пектиназ і ліпаз та є перспективними для застосування у біотехнології.

К л ю ч о в і с л о в а: Антарктида, бактерії роду *Bacillus*, гідролітичні ферменти.

