

## ПРОТЕОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ САПРОФІТНИХ БАКТЕРІЙ ВОДИ І ДОННИХ ОСАДІВ ПІВНІЧНИХ МОРІВ

П. Тихонов

*Одеський державний аграрний університет*

*Досліджено протеолітичну активність культур сапрофітних бактерій води і донних осадів різної глибини залягання в місцях нафтогазорозвідки та суміжному фоновому районі. Наведені дані щодо впливу температурних умов культивування на компонентний склад білків бактерій, що належать до різних екологічних груп.*

**Ключові слова:** *протеолітична активність, вода, донні осади.*

**Вступ.** Білки і пептиди, що розчинені у воді та адсорбовані донними осадами є важливим джерелом азоту та енергії для бактерій. Вони складають значну долю розчинених органічних речовин морської води [1, 2]. Перед споживанням бактеріями білки повинні бути гідролізовані до амінокислот або олігопептидів [3-7]. Продукти гідролізу підпадають мінералізації після чого можуть бути використані фотосинтетичними організмами. Стале функціонування екосистем визначається процесами енерго- та масообміну. Абсолютно необхідною умовою підтримки сталого стану хімічного складу навколишнього середовища є збалансованість процесів синтезу і розкладання органічних речовин. Порушення навіть одного з них може призвести до важкопередбачуваних наслідків. Протеолітична активність природних вод і донних осадів забезпечується екзо- і ендоферментами водних організмів, в першу чергу мікроорганізмів, зокрема бактерій. Знання того, як контролюється гідроліз білків морської води і донних осадів, необхідне для розуміння бактеріальної утилізації білків в морі та для оцінки рівня продукційно-деструкційних процесів в екосистемах морів.

Основними деструкторами білків морської води і донних осадів є сапрофітні бактерії. Активність їх функціонування визначається насамперед рівнем забезпеченості органічними речовинами та температурою навколишнього середовища [8]. В арктичних морях розповсюджені три екологічні форми: психрофіли, психротрофи та мезофіли [9].

Визначення ролі окремих екологічних форм сапрофітних бактерій в розкладанні білків морської води і донних осадів необхідне для з'ясування їх внеску в кругообіг азоту, що вивільняється при розкладанні білків, та, відповідно, у формування продуктивності морських екосистем. За даними досліджень Б. Матиашвили [10] середня чисельність бактерій в шарі придонної води (1-3 см від дна) складала близько 500 тис клітин в 1 мл, а в 1 г сирого донного осаду була на три порядки вище цієї величини. Відсоткове співвідношення морфологічних груп бактерій показує домінування коковидних форм як у воді, так і в донних осадах. Співвідношення коковидних, бацилярних та кокобацилярних форм для води і донних осадів склали відповідно: 44%, 33%, 22% та 60%, 21%, 15% (решта — інволютні клітини). Середні об'єми клітин склали для бактеріопланктону — 0,21 мкм<sup>3</sup>, а для бактеріобентосу — 0,15 мкм<sup>3</sup>. Біомаса бактерій склали 133,4 мг/м<sup>3</sup> води та 0,068 мг/г сирого осаду.

**Метою** даного дослідження було визначення інтенсивності процесів деструкції речовин білкової природи в воді і донних осадах Баренцева моря в місцях проведення нафтогазорозвідки та в суміжному фоновому районі (Дальнєзеленецький розріз) у зв'язку з оцінкою можливого впливу бурових робіт на початкові етапи циклу азоту в морських екосистемах північних морів, а також впливу температурних умов культивування на компонентний склад сумарних білків культур сапрофітних бактерій.

**Матеріал і методика досліджень.** Матеріалом досліджень були культури сапрофітних бактерій, що були виділені з води та донних осадів Баренцева моря. Проби води відбирали простерилізованими 96%-им етиловим спиртом батометрами Нансена та 5-літровим пластиковим батометром. Проби донних осадів і придонної води відбирали простерилізованим стандартним стратометром з діаметром труби 40 мм.

Приналежність бактерій до тієї чи іншої екологічної форми визначали за здатністю до росту при 2, 12, 16, 22 і 37<sup>0</sup>С. Досліджували вплив зазначених температурних умов культивування на компонентний склад сумарних білків культур сапрофітних бактерій. Для культивування сапрофітних евтрофних бактерій використовували стандартний рибобептонний агар. В даній роботі визначали протеолітичну активність культур психрофільних і мезофільних бактерій.

Білки аналізували методом електрофорезу в денатуруючих умовах за присутності додецилсульфату натрію [11]. Застосовували 12,5%-ий розділюючий поліакриламідний гель. Стандартами молекулярної маси були карбоангідраза, овальбумін, бичий сиворотковий альбумін та фосфорілаза В — 29, 46, 68 та 92,5 кД, відповідно.

Ефективність деструкції речовин білкової та пептидної природи культурами бактерій та донними осадами визначали за рівнем протеолітичної активності вказаних зразків. Протеолітичну активність визначали спектрофотометрично за гідролізом синтетичного субстрату — БАПНА (N- $\alpha$ -бензоїл-L-аргінін-пара-нітроанілід) [12]. Вимірювання оптичної щільності проводили при 382,5 нм. Активність позначали в одиницях/мг білка для культур бактерій та в одиницях/г донних осадів. За одиницю активності приймали кількість ферменту, що гідролізувала 1 мкм БАПНА за 1 хвилину інкубації.

Концентрацію білка визначали спектрофотометрично [13].

**Результати та їх обговорення.** Активність протеолітичних ферментів мезофілів складала  $0,2-0,3 \times 10^{-3}$ , а психрофілів —  $0,7-1,6 \times 10^{-3}$  одиниць/мг білка. В той же час виявлено одиничні культури мезофілів і психрофілів, активність протеаз яких була однаковою і достатньо високою —  $3,4-3,5 \times 10^{-3}$  одиниць/мг білка. Наведені величини активності протеолітичних ферментів визначені при 30<sup>0</sup>С. Дані температурні умови стандартні при визначенні активності протеаз [14]. Крім того вимірювання активності цих ферментів проводили при температурі, що є близькою до природньої — при 2<sup>0</sup>С. В цьому випадку в обох екологічних груп бактерій виявлено набагато нижчі рівні протеолітичної активності. Активність ферментів психрофілів коливалася в межах  $0,15-0,3 \times 10^{-3}$ , а мезофілів —  $0,2-0,3 \times 10^{-4}$  одиниць/мг білка, тобто у психрофілів вона була на порядок вище.

Наведені результати стосуються бактеріальних культур, які після виділення зберігалися при 2<sup>0</sup>С. В наших дослідах не визначався температурний оптимум активності протеолітичних ферментів, однак можна припустити, що температура культивування і зберігання бактерій може впливати певним чином на активність ферментів. Дійсно, активність протеаз психрофільних бактерій була більше за таку у мезофілів при 2<sup>0</sup>С та 30<sup>0</sup>С, хоча друга температура більш оптимальна для функціонування мезофілів, ніж для психрофілів. Ймовірно, в даному випадку визначальною є температурна адаптація синтезу ферментів, яка в свою чергу визначає ефективність функціонування ферментів, а не термоадаптація ферментів самих по собі.

Наші висновки щодо того, що активність ферментів психрофілів, як правило, вище за активність ферментів мезофілів при низьких температурах функціонування підтверджується даними інших авторів [9, 15, 16].

В той же час слід зазначити суперечливість даних щодо ефективності функціонування протеолітичних ферментів психрофілів і мезофілів. З одного боку, є свідчення того, що енергія активації екзогенних протеаз арктичних психрофільних бактерій в 3-5 разів нижче за таку мезофілів, з іншого боку, виявлені психрофіли, що продукують протеази, енергія активації яких подібна до такої мезофілів [9]. Наші дані також свідчать на користь неоднозначності таких оцінок, оскільки виявлено культури психрофілів і мезофілів, що продукують протеази, які за однакових умов функціонування виявляють однакову активність.

Активність протеаз психрофілів при 30<sup>0</sup>С була приблизно в 5 разів вища, ніж при 2<sup>0</sup>С, хоча перша температура набагато вища за оптимальну для розвитку психрофілів. Такі ж факти, які важко пояснити, наводять інші автори [9]: оптимуми активності позаклітинних гідролаз спостерігалися за температур, які перевищували на 30-40<sup>0</sup>С температурні оптимуми їх синтезу та на 15-20<sup>0</sup>С — оптимуми росту бактерій.

Протеолітична активність досліджених культур психрофілів більш висока у порівнянні з мезофілами. Враховуючи, що психрофіли чисельно переважають мезофіли (82% і 18%,

відповідно), можна вважати, що перші роблять більш вагомий внесок у деструкцію білків морської води і донних осади.

Значення протеолітичної активності в донних осадах коливалися в залежності від глибини залягання зразку від  $1,6 \times 10^{-6}$  до  $8,4 \times 10^{-5}$  одиниць/г сирого донного осаду. У поверхневому горизонті (0-0,5 см) протеолітична активність була на порядок вище, ніж у нижчих шарах (5 та 10 см). Причому, якщо при переході від горизонту 0-0,5 см до 5 см відзначається різке зниження активності, то при переході від горизонту 5 см до 10 см величини активності мають один і той же порядок. В горизонті 10 см визначається незначне зростання активності у порівнянні з 5-см горизонтом. В горизонті 0-0,5 см варіювання цього показника склало  $6-8,4 \times 10^{-5}$  одиниць/г, в горизонті 5 см —  $1,6-2,1 \times 10^{-6}$  одиниць/г, в горизонті 10 см —  $2,7-3,8 \times 10^{-6}$  одиниць/г.

Не виявлено розбіжностей рівней деструкції білкових речовин в донних осадах в районі проведення нафтогазорозвідки та в суміжному фоновому районі (Дальнєзеленецький розріз). В обох районах максимальні значення протеолітичної активності виявлені в поверхневому горизонті. В районі бурових робіт цей показник варіював в межах  $6,0-7,6 \times 10^{-5}$  одиниць/г, в суміжному фоновому районі —  $6,0-7,5 \times 10^{-5}$  одиниць/г. В шарах осади, що розташовані нижче відмічалася така сама закономірність.

Рівень поліморфізму сумарних білків сапрофітних бактерій, що належать до різних екологічних груп, достатньо високий. Білки сапрофітних бактерій гетерогенні за молекулярною масою і містять від 60 до 100 дискретних компонентів у діапазоні молекулярних мас від 12 до 200 кД, залежно від досліджуваної культури. Електрофоретичний спектр, як правило, відносно рівномірно насичений у досліджуваному діапазоні молекулярних мас. У деяких випадках виявлялися переважаючі компоненти. В основному це стосувалося низькомолекулярних компонентів (менш ніж 29 кД), а також компонентів у діапазоні молекулярних мас 46-68 кД. В електрофоретичних спектрах сумарних білків не виявлено специфічних компонентів, що притаманні окремим екологічним групам сапрофітних бактерій.

Різні температурні умови культивування, як правило, не спричиняли впливу на якісний склад електрофоретичних спектрів білків, впливаючи головним чином на перерозподіл відносного вмісту окремих молекулярно-вагових фракцій.

Водночас виявлено низку культур мікроорганізмів, культивування яких за різних температур призводить до появи або зникнення окремих компонентів. Це характерно як для культур психрофілів, так і мезофілів.

**Висновки.** Таким чином, одержані результати свідчать за відсутність розбіжностей в рівні деструкції речовин білкової природи в донних осадах в місцях проведення нафтогазорозвідки та в суміжному фоновому районі.

Температура культивування впливає головним чином на перерозподіл відносного вмісту окремих молекулярно-вагових фракцій, а не на якісний склад білків сапрофітних бактерій.

Внесок психрофільних сапрофітних бактерій в деструкцію розчинених білків морської води і донних осади Баренцева моря набагато більший за такий мезофільних бактерій.

### Список використаних джерел

1. Sharp J.H. (1983). The distribution of inorganic nitrogen and dissolved and particulate organic nitrogen in the sea. In: Carpenter E.J., Capone D.G. (eds.) Nitrogen in the marine environment. Academic Press, N.Y.-London, p. 1-35.
2. Хайлов К.М. (1971). Экологический метаболизм в море. К.: Наукова думка. 252 с.
3. Willian A. Strohl, Harriet Rouse, Pamela C. Champe, Richard A. Harvey. (2007). Microbiology - Lippincott's illustrated Reviews, Lippincott William & Wilkins, 524 p.
4. Дин Р. (1981). Процессы распада в клетке. М., Мир. 120 с.
5. Law B.A. (1980). Transport and utilization of proteins by bacteria. In: Payne J.W. (ed.) Microorganisms and nitrogen sources. John Whilley & Sons, Chichester, p. 381-409.
6. Rosso A.L., Azam F. (1987). Proteolytic activity of coastal oceanic waters: depth distribution and relationship to bacterial populations. Marine Ecology. Progress Series. v. 41, p. 231-240.
7. Mayer L.M. (1989). Extracellular proteolytic enzyme activity in sediments of an intertidal mudflat. Limnol. and Oceanogr. v. 34, № 6, p. 973-981.

8. Роуз Э. (1971). Химическая микробиология. М., Мир. 294 с.
9. Лях С.П. (1976). Адаптация микроорганизмов к низким температурам. М., Наука. 160 с.
10. Матиашвили Б.В. (1988). Сравнение количественных характеристик бактериопланктона и бактериобентоса Баренцева моря. Экология, биологическая продуктивность и проблемы марикультуры Баренцева моря. Тезисы докладов II Всесоюзной конференции. Мурманск. с.56-57.
11. King J., Laemmli U.K. (1971). Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. J. Mol. Biol. v. 61, p. 465-477.
12. Erlanger B.F., Kokowski N., Cohen W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys. v. 95, p.271-278.
13. Whitaker J.R., Granum P.E. (1980). An absolute method for protein determination based on differences in absorbance at 235 and 280 nm. Anal. Biochem. v. 109, № 1, p. 156-159.
14. Мосолов В.В. (1971). Протеолитические ферменты. М., Наука. 414 с.
15. Yumiko Obayashi, Satoru Suzuki (2005). Proteolytic enzymes in coastal surface seawater: Significant activity of endopeptidases and exopeptidases. Limnol. and Oceanogr. v. 50, № 2, p. 722-726.
16. Piontek J., Borchard C., Sperling M., Schulz K.G., Riebesell U., Engel A. (2013). Response of bacterioplankton activity in an Arctic fjord system to elevated pCO<sub>2</sub>: results from mesocosm perturbation study. Biogeosciences. v. 10, p. 297-314. //www.biogeosciences.net/10/297/2013/<https://doi:10.5194/bg-10-297-2013>

## PROTEOLYTIC ACTIVITY OF SAPROPHYTIC BACTERIA OF WATER AND BOTTOM SEDIMENTS OF THE NORTHERN SEAS

Tykhonov P.

*The proteolytic activity of cultures of saprophytic bacteria of water and bottom sediments of different depths in oil and gas exploration areas and adjacent background area has been studied. Data on the influence of cultivation temperature conditions on the component composition of bacterial proteins belonging to different ecological groups are presented.*

**Key words:** proteolytic activity, water, bottom sediments.