



УДК 606:57.063.8:577.15:061.62(574):579

ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ И КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ БАЦИЛЛ, ОБЛАДАЮЩИХ ЛИПОЛИТИЧЕСКОЙ, ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ И ЛИПАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

З.С. Сармурзина, С.С. Ануарбекова, К.Х. Алмагамбетов

ДГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» РГП «НЦБ РК» КН МОН РК, г. Астана

Бациллы являются одними из активных продуцентов биологически активных веществ, в том числе ферментов. Нами были выделены бациллярные микроорганизмы из различных экологических ниш. Выделенные изоляты бацилл отнесены к различным видам *Bacillus sp.* Проведен скрининг по протеолитической, липолитической и липазной активности среди изолятов и коллекционных штаммов бацилл Республиканской коллекции микроорганизмов. Отобраны 48 наиболее активных изолятов и 11 штаммов культур бацилл.

Введение

Аэробные спорообразующие бактерии составляют довольно обширную группу микроорганизмов. Они широко распространены в природе и играют большую роль в разнообразных биологических процессах. С использованием этих бактерий в промышленности освоено производство ценных ферментов: липазы [1-3], протеазы [4], амилазы, глюкоизомеразы, пептидогидролазы, расщепляющие полисахариды, белки, жиры и другие макромолекулы; которые легко выделяются, растут на дешевых средах с выходом большой биомассы [5, 6].

Целью данного исследования было выделение культур бацилл, обладающих протеолитической, липолитической и липазной активностью.

Материалы и методы

Объектами исследования были 172 изолята микроорганизмов, выделенные из различных экологических ниш и 32 штамма культур бацилл РКМ.

Выделение культур бацилл [7] из природных источников осуществляли по общепринятым методам с соблюдением

правил асептики. Посев производили по методу Гоулда на мясопептонный агар (МПА), сусло-агар, среду Громыко. Чашки инкубировали при 29°C и 37°C. Через 3-5 суток инкубации проводили отбор колоний с характерными признаками для бацилл.

Родовую и видовую принадлежность выделенных изолятов определяли по общепринятым в бактериологической практике методам [8-15].

Определение протеолитической активности проводили, используя в качестве субстрата казеин и желатин [8].

Для выявления липолитической активности по отношению к твинам [8] исследуемые микроорганизмы высевали на среды, содержащие твины 20, 60, 80 (лауриловая, стеариновая и олеиновая жирные кислоты соответственно).

Качественное определение липолитической активности по отношению к органическим жирам проводят [16], используя бараний, говяжий, свиной жиры и растительное масло.

Готовят жир нужного типа, окрашенный нильским голубым сернокислым. Добавляют 1 мл эмульсии в 20 мл агара, расплавленного и охлажденного до 45-50°C.



Смесь хорошо перемешивают и разливают в чашки. Положительная реакция – образование синего ореола вокруг колоний.

Определение липазной активности

Активность липазы определяют [8] титрованием щелочью свободных жирных кислот, образующихся из оливкового масла в результате действия фермента. Реакционную смесь, содержащую 0,5 мл оливкового масла, 5 мл ацетатного буфера (рН 5,6) [17], 10 мМ CaCl_2 и 50-100 мкл раствора фермента, инкубируют при 30°C в течение 30 мин на магнитной мешалке. Реакцию останавливают добавлением 20 мл этанола. Количество образовавшихся жирных кислот определяют титрованием 0,1 н. КОН с индикатором фенолфталеином. Контролем служит проба с прокипяченным раствором фермента. Результаты титрования контроля вычитают из данных опытных проб. Активность липазы выражают в миллилитрах 0,1 н. КОН. За единицу липазной активности принимают количество 0,1 н. щелочи, пошедшей на титрование 1 мкмоль жирных кислот, образующихся за 1 мин.

Результаты и обсуждение

В ходе исследовательской работы было изучено 172 изолята бацилл, выделенные из различных источников окружающей среды: почва, зерновые отходы, мука, хлеб, сточные воды мясокомбината, канализационные трубы, речная вода, экстракты цветов календулы и осота полевого, различные сорта винограда, кисломолочные продукты домашнего изготовления. Также в работе были изучены 32 штамма культур бацилл, находящихся на хранении в Республиканской коллекции микроорганизмов (РКМ), представленные следующими видами: *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. acidocoldarius*, *B. firmus*.

Родовая принадлежность выделенных изолятов бацилл к роду *Bacillus* определяли по морфо-культуральным признакам.

При определении *протеолитической активности на молочном агаре* наибольшей активностью обладают выделенные изоляты *Bacillus sp.* Zb 11, Zb 23, Zb 32, Zb 52 (диаметр зон лизиса 10-15 мм). Среди коллекционных культур бацилл штаммы *B. subtilis* ИПМ-215, *B. polymyxa* 1459-B и *B. subtilis* 65 обладают наибольшей активностью (диаметр зон лизиса 9-10 мм), что продемонстрировано на рисунке 1. Штаммы *B. thuringiensis* Z-52, *B. thuringiensis* BTS-393, *B. thuringiensis* 4-Cr 06, *B. subtilis* ATCC-6633, *B. subtilis* 82, *B. subtilis* 168, *B. acidocoldarius* BT-90, *B. thuringiensis* 49, *B. subtilis* НИ-1 менее активны (5-7 мм).

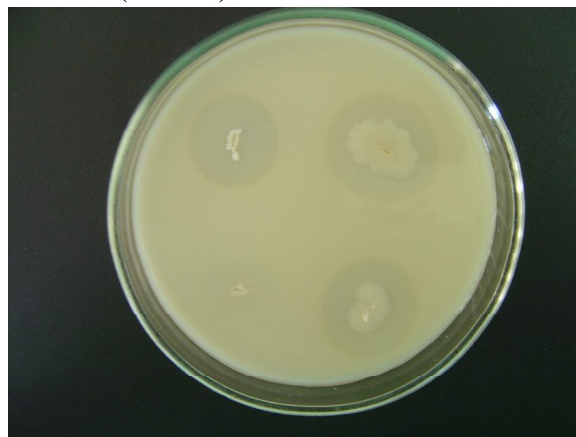


Рис. 1. Гидролиз казеина коллекционными штаммами бацилл

При определении *протеолитической активности на желатине* разжижение желатины отмечалось только у коллекционных штаммов культур бацилл: *B. subtilis* 65, *B. thuringiensis* Z-52 v-3, *B. thuringiensis* BTS-393, *B. subtilis* ИПМ-215, *B. thuringiensis* kurstaki к-Ум 07/КБ, *B. thuringiensis* 4-Cr 06.

При определении *липолитической активности по отношению к твинам жирных кислот* среди выделенных изолятов *Bacillus sp.* Zb 17, Zb 45, Zb 80, Zb 22, Zb 3, Zb 60, Zb 28, Zb 32, G13, G26 и G27 обладали наибольшей активностью (диаметр непрозрачной зоны 10-12 мм). Изоляты *Bacillus sp.* G12, G22, G23, G24, G25 (рис. 2) обладали данной активностью по отношению ко всем исследуемым твинам лауриловой,



стеариновой и олеиновой жирных кислот, где данная активность варьирует в пределах 3-6 мм.

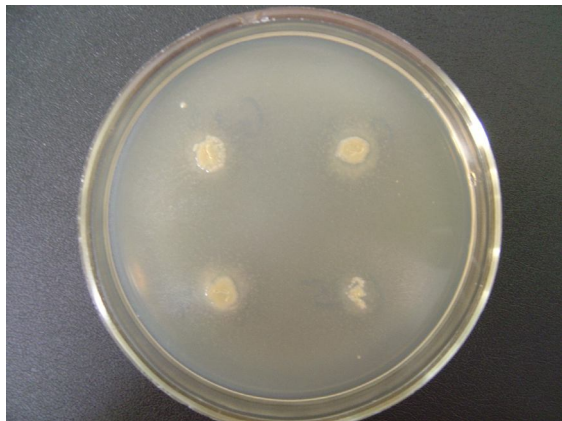


Рис. 2. Липолитическая активность изолятов на среде с твином 20

У остальных выделенных изолятов липолитическая активность составляла в пределах 3-9 мм. Среди коллекционных культур микроорганизмов у штаммов *B. subtilis* ATCC-6633, *B. subtilis* 720 и *B. subtilis* 1-304/pMX 45 наблюдается самая высокая липолитическая активность, что соответствует диаметру непрозрачной зоны 13-20 мм.

При изучении липолитической активности по отношению к органическим жирам *Bacillus* sp. Zb 60, Zb 82, Zb 30, Zb 105, Zb 66, Zb 68, Zb 31, G13, G15, G17, G22, G23, G24, G25 проявили активность ко всем исследуемым жирам: бараний, говяжий, свиной, растительное масло (рисунок 3).

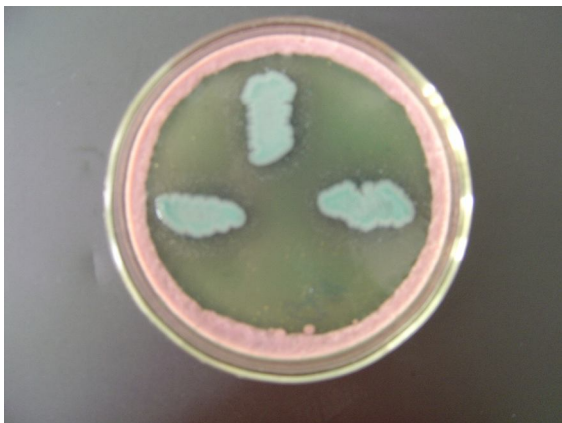


Рис. 3. Липолитическая активность изолятов на среде с говяжьим жиром

Среди коллекционных культур штаммы *B. thuringiensis* B12C, *B. subtilis* 30, *B. thuringiensis* BTS-393, *B. thuringiensis* Z-52, *B. thuringiensis* Z-52 v-3, *B. subtilis* PR 28, *B. polymyxa* DH, *B. thuringiensis* A1, *B. thuringiensis* Z-52 v-3, *B. thuringiensis* BTS-393 обладали липолитической активностью на средах, содержащих бараний, говяжий и свиной жиры.

При изучении липазной активности контрольная проба с прокипяченным раствором фермента составляла 1,3 ЕД. Липазная активность варьировала в пределах 1,5-5,0 ЕД. Среди выделенных изолятов высокая липазная активность наблюдается у изолятов G13, G15, G17, G22, G23, G24, G25 (активность липазы составила 4,0-5,0 ЕД). Изоляты G2, G6, G5, G8, G12, G29 менее активны (липазная активность наблюдалась в пределах 1,6-1,9 ЕД). У остальных изолятов активность липазы составила 2,0-3,1 ЕД. Среди коллекционных культур микроорганизмов высокая липазная активность наблюдается у *B. subtilis* 720, *B. subtilis* ATCC-6633, *B. subtilis* 1-304/pmx 45 (содержание липазы в количестве 3,0-4,4 ЕД).

Итак, основная масса изолятов и коллекционных штаммов бацилл являются ферментоактивными по отношению к изученным нами субстратам.

На основании данного исследования для дальнейшей работы было отобрано 48 наиболее активных изолятов бацилл. У них были изучены культуральные, морфологические и биохимические свойства для оценки видовой принадлежности.

Изучаемые нами объекты грамположительные, подвижные палочковидные бактерии, с округлыми концами, располагаются одиночно, в виде цепочек или скоплениями. Образуют эллипсовидные или сферические эндоспоры, расположенные центрально или терминально.

На исследуемых твердых питательных средах выделенные бациллы образуют выпуклые или плоские, блестящие колонии от беловато-серого до коричневого цвета, слегка с приподнятой складчатостью, пра-



вильной круглой формы, края колоний ровные. Размеры варьируют от точечных до гигантских (2-10 мм), однородной структуры.

Все исследуемые изоляты каталазо-положительны. Изоляты *Bacillus sp.* Zb 3, Zb 9, Zb 13, Zb 17, Zb 22, Zb 31, Zb 32, Zb 70, G6, G8, G17 – оксидазоотрицательны, остальные оксидазоположительны. Глюкозу усваивают все исследуемые изоляты, за исключением *Bacillus sp.* G 2, G 4, G 9, G 20, 26, G 28. Оптимальная температура роста 37-40°C.

Реакция на фенилаланин и тирозин – отрицательная, желатину не разжижают, редукция нитратов, дезаминирование фенилаланина не наблюдается. Не обладают лецитиназной и плазмокоагулазной активностью. Индол не образуют. Признаки ферментации фруктозы, ксилозы, маннозы, сахарозы, дульцита, сорбитола, мальтозы, лактозы, маннита были вариабельны для всех изолятов.

На основании полученных результатов проведен анализ: 17 выделенных изолятов отнесены к виду *Bacillus subtilis*, 7 изолятов – к виду *Bacillus licheniformis*, 5 изолятов – к виду *Bacillus pumilus*. 19 выделенных изолятов определены как виды с неясным систематическим положением.

Выводы

В ходе выполнения работы нами было получено 172 изолята бацилл, выделенные

из различных экологических ниш.

Изучены протеолитическая активность, липолитическая активность по отношению к твинам, липолитическая активность по отношению к органическим жирам, липазная активность, определена родовая и видовая принадлежность на основе изучения культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств.

При изучении протеолитической, липолитической активности и липазной активности нами отобраны самые активные изоляты: *Bacillus sp.* Zb 17, Zb 45, Zb 80, Zb 22, Zb 3, Zb 60, Zb 28, Zb 32, Zb 60, Zb 82, Zb 30, Zb 105, Zb 66, Zb 68, Zb 31, G13, G15, G17, G22, G23, G24, G25. Среди коллекционных культур микроорганизмов также отобраны штаммы, обладающие высокой ферментативной активностью: *B. polymyxa* DH, *B. thuringiensis* A1, *B. subtilis* 1-304/pMX 45, *B. subtilis* ATCC-6633, *B. subtilis* 720, *B. thuringiensis* B12C, *B. subtilis* 30, *B. thuringiensis* BTS-393, *B. thuringiensis* Z-52, *B. thuringiensis* Z-52 v-3, *B. subtilis* PR 28.

Таким образом, среди изученных нами объектов, как выделенных изолятов, так и коллекционных штаммов РКМ, отобраны ферментативноактивные культуры. Полученные результаты и выявленные в ходе исследования активные объекты: 48 выделенных изолятов и 11 коллекционных штаммов будут рекомендованы для использования в различных сферах науки и биотехнологической промышленности.

Литература

1. Основные систематические группы бактерий и актиномицетов. Интернет-ресурсы: <http://plant.geoman.ru> «Жизнь растений».
2. Heravi K.M., Eftechar F., Yakhchali B., Tabandeh F. Isolation and identification of a lipase producing *Bacillus sp.* from soil // Pakistan Journal of Biological Sciences. – 2008. – Vol. 11 (5), P. 740-745.
3. Mohan T.S., Palavesam A., Immanuel G. Isolation and characterization of lipase-producing *Bacillus* strains from oil mill waste // African journal of biotechnology. – 2008. – Vol. 7 (15), P. 2728-2735.
4. Африкян Э.Г. Аэробные спорообразующие бактерии и их энтомопатогенные свойства: Автореф. ... докт. биол. наук: 03.00.07. / МГУ. – М., 1970. – 38 с.
5. Основы биотехнологии: учеб. пособие для высш. пед. учеб. заведений / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – 3-е изд. стер. – М.: Академия, 2006. – С. 73-74.



6. Патент России (11) 2298032 (13) С2. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719-продуцент антагонистически активной биомассы в отношении болезнетворных микроорганизмов, а также протеолитических, амилалитических и липолитических ферментов / Михайлова Н.А., Гатауллин А.Г., опубли. 27.04.2007. – 3 с.
7. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии / Под ред. В.К. Шильниковой. – 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.
8. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
9. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под редакцией Н.С. Егорова. – М.: Издательство Московского университета, 1985. – С. 122-128.
10. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Смита и др. – М.: Мир, 1997. – В 2 томах. – 800 с.
11. Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий группы *B. subtilis-mesentericus* из организма. – 150 с.
12. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактериальной группы *B. subtilis-mesentericus* из организма человека и животных // Под ред. В.В. Смирнова. – Киев: Наукова думка, 1982. – С. 3-25.
13. Желдакова Р.А. Выделение и идентификация микроорганизмов: Учебно-методическое пособие для студентов G 310101 «Биология» специализация - G 310101 – 0206 «Микробиология». - Минск, 2003. – 20 с.
14. Борисова А.Б. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. - М.: Медицина, 1979. – С. 58.
15. Бабаева Т.А. Морфолого-культуральные и физиологические свойства спорообразующих бактерий // Уч. зап. Азерб. ун-та. Серия биол. наук – 1973. - №4. – С. 22-28.
16. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии. - М.: Мир, 1984. - В 3-х т. - Т.3, 261 с.
17. ГОСТ 9.801 - 82 Государственный стандарт Союза ССР Единая система защиты от коррозии и старения БУМАГА Методы определения грибоустойкости Unified system of corrosion and ageing protection. Paper. Test methods by fungus resistance.

Түйін

Бацилалар биологиялық белсенді заттардың сонымен қатар ферменттердің белсенді продуценттерінің бірі болып табылады. Біз түрлі экология бөліктерінен бацеларлы микроағзалар бөліп алдық. Бөлініп алынған бацилла изоляттары *Bacilla* sp. әр қилы түріне жатқызылды. Республикалық микроағзалар коллекциясындағы коллекциялық штаммдар мен изоляттар ішінде протеолыздік, липолиздік және липазалық белсенділіктері бойынша скрининг жүргізілді. Бацилла дақылдарының ең белсенді 48 изоляттары және 11 штаммдары таңдалып алынды.

Summary

Bacilli are one of the active producing biological substances, including ferments. We isolated bacilli microorganisms from different ecological niches. These microorganisms relate to various species *Bacillus* sp. We have screened analyses of proteolytical, lipolytical and lipase activity among isolates and cultural bacilli of Republic collection of microorganisms. 48 of the most active isolates and 11 of cultural bacilli were selected.