

МИКРОБИОЛОГИЯ КРИОСФЕРЫ

УДК 663.15; 551.34

DOI: 10.21782/KZ1560-7496-2017-5(63-71)

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ
РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ РОДА *BACILLUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ
ИЗ МЕРЗЛЫХ ОТЛОЖЕНИЙ

О.В. Доманская¹, В.П. Мельников¹⁻³, Л.В. Огурцова¹, А.В. Соромотин¹,
В.О. Доманский³, Н.В. Полякова¹

¹ Тюменский государственный университет, кафедра криософии,
625003, Тюмень, ул. Володарского, 6, Россия; olga-nv@bk.ru

² Тюменский научный центр СО РАН, 625026, Тюмень, ул. Малыгина, 86, Россия; melnikov@ikz.ru

³ Тюменский индустриальный университет, 625000, Тюмень, ул. Володарского, 38, Россия; vdomanskiy@gmail.com

Изучены кинетические параметры роста и ферментативная активность в зависимости от температуры культивирования бактериальных штаммов рода *Bacillus*, выделенных из многолетнемерзлых пород. Образцы отобраны из керна скважин, пробуренных в районе Тарко-Сале (север Западной Сибири) и вскрывших верхне- и среднелейстоценовые отложения IV морской террасы (mIII₁, mII₂₋₄). Установлено, что кинетика роста и ферментативная активность бактерий в диапазоне температур от 5 до 45 °С существенно меняются, отражая адаптационный потенциал *Bacillus* spp. Продемонстрировано, что в условиях низких температур большая часть исследуемых штаммов бактерий обладала высокой каталазной, дегидрогеназной, амилитической, протеолитической и липолитической активностью.

Merzlye porody, bakterii Bacillus, ekstremozimy, kinetika rosta, fermentativnaya aktivnost

SOME FEATURES OF ENZYME ACTIVITY IN DIFFERENT STRAINS
OF THE *BACILLUS* GENUS ISOLATED FROM PERMAFROST

O.V. Domanskaya¹, V.P. Melnikov¹⁻³, L.V. Ogurtsova¹, A.V. Soromotin¹,
V.O. Domanskiy³, N.V. Polyakova¹

¹ Tyumen State University, Department of Cryosophy, 6, Volodarskogo str., Tyumen, 625003, Russia; olga-nv@bk.ru

² Tyumen Scientific Centre, SB RAS, 86, Malygina str., Tyumen, 625026, Russia; melnikov@ikz.ru

³ Tyumen Industrial University, 38, Volodarskogo str., Tyumen, 625000, Russia; vdomanskiy@gmail.com

The kinetics of growth and activity of enzymes in bacterial strains of the *Bacillus* genus isolated from permafrost are studied as a function of incubation temperatures. Viable bacteria were found in permafrost in the area of Tarko-Sale in northern West Siberia. The selected permafrost core samples are Upper and Middle Pleistocene alluvial and lacustrine deposits of marine terrace IV (mIII₁, mII₂₋₄). The *Bacillus* spp. strains change notably in growth kinetics and enzyme activity as temperatures vary from 5 to 45 °C, which is evidence of their adaptation ability. Activity of catalase, dehydrogenase, amylase, protease and lipase enzymes is high at low temperatures in most of the analyzed bacterial strains, which has important biotechnological implications.

Permafrost, Bacillus bacteria, extremozymes, growth kinetics, enzyme activity

ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы являются неотъемлемой составляющей льда или другой мерзлой породы. Пребывание микробиоты в экстремальных условиях (например, при пониженной температуре) способствует проявлению у нее уникальных особенностей, в частности активности специфических ферментов. Поэтому изучение микроорганизмов в условиях криолитозоны представляет научный и практический интерес.

В последние годы появилось много научных статей о возможности существования микроорганизмов в экстремальных условиях. Особый интерес представляют работы, связанные с изучением биохимических модификаций и физиологических изменений, происходящих в бактериальной клетке, и оценкой их метаболической активности под воздействием низких температур [Nikrad et al., 2016; Baraúna et al., 2017]. В работе Е.М. Ривкиной

с соавт. [Rivkina et al., 2000] отмечена метаболическая активность бактерий в мерзлых отложениях при -20°C в стационарной фазе, которая достигается менее чем через год после замораживания. Устойчивые к низким температурам микроорганизмы служат как источниками новых метаболитов, белков, так и продуцентами экстремозимов – ферментов, стабильных в широком диапазоне физико-химических условий [MacElroy, 1974; Coker, 2016]. Изучение способности микроорганизмов к жизнедеятельности в условиях низких температур открывает новые возможности для использования их в промышленности, сельском хозяйстве, медицине и биотехнологии, тем самым повышая ценность арктической микрофлоры – возобновляемого криобиологического ресурса [Мельников, Геннадюк, 2011; Мельников, 2012; Stan-Lotter, Fendrihan, 2011; Feller, 2013]. Большинство научных работ отечественных и зарубежных исследователей посвящены изучению разнообразия бактериальных сообществ в различных объектах криосферы [Гиличинский и др., 1989; Звягинцев и др., 1990; Cameron, 1972; Vorobyova et al., 1997; Hansen et al., 2007] и в меньшей степени изучению их практического потенциала, в частности ферментного комплекса.

Практический интерес к ферментам психрофильных и психротолерантных микроорганизмов связан с их высокой активностью в более широком диапазоне температур и рН среды по сравнению с мезо- и термофильными микроорганизмами, широко применяемыми в настоящее время в биотехнологии. Использование ферментов психрофильных и психротрофных микроорганизмов позволит свести к минимуму нежелательные химические реакции, которые могут происходить при более высоких температурах [Bowman et al., 2005; Gesheva, Vasileva-Tonkova, 2012; Vester et al., 2014].

К ферментам, имеющим высокую каталитическую активность при низких температурах, относят амилазы, липазы, протеазы, лактамазы, целюлазы, ксиланазы, хитиназы и пектиназы. Большой интерес для исследователей представляют холодоактивные протеазы, нашедшие широкое применение в пищевом производстве, фармацевтической промышленности, в производстве детергентов [Kasana, 2010; Joshi, Satyanarayana, 2013]. Вторую по значимости группу ферментов составляют амилазы, используемые в пищевой, текстильной и бумажной промышленности [Konsoula, Liakopoulou-Kyriakides, 2007; Kuddus et al., 2012]. Третья группа широко применяемых ферментов представлена липазами, выполняющими роль биокатализаторов в пищевой, целлюлозно-бумажной и текстильной промышленности, производстве детергентов и др. [Петровская и др., 2012; Maiangwa et al., 2015].

При сравнении активности одинаковых ферментов у мезо- и психрофильных бактерий в работе [D'Amico et al., 2002] было установлено, что ферменты мезофильных бактерий имели низкую активность, а в некоторых случаях наблюдалось и полное отсутствие активности при низкой температуре. В настоящее время только 1–2 % микроорганизмов применяется в коммерческих целях, и среди них есть лишь несколько примеров использования экстремофилов [Gome, Steiner, 2004].

Революционные изменения в молекулярной биологии ведут к развитию крупномасштабного производства многих ценных экстремозимов и использования их в биокаталитических процессах. Несмотря на значительные успехи последнего времени, знания о физиологии, метаболизме, энзимологии и генетике микроорганизмов-экстремофилов по-прежнему ограничены.

Цель настоящей работы – исследование влияния температуры на параметры роста и ферментативную активность некоторых штаммов рода *Bacillus*, выделенных из мерзлых отложений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были исследованы бактерии рода *Bacillus*, ранее выделенные из мерзлых отложений Западной Сибири (район Тарко-Сале) [Доманская и др., 2015]. В результате микробиологического анализа образцов было выделено 9 чистых культур *Bacillus* spp. Видовая идентификация этих штаммов проводилась по культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим свойствам. Для подтверждения таксономического статуса штаммы бактерий идентифицировали путем анализа последовательностей фрагментов гена 16S рНК, полученных в реакции ПЦР с использованием праймеров 8f (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG), 926r (CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT) и 1492r (GGT TAC CCT TGT TAC GAC TT). Секвенирование осуществляли в ГосНИИгенетики (Москва). Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями из международного банка данных NCBI с помощью пакета программ BLAST URL [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi]. Для редактирования и выравнивания нуклеотидных последовательностей генов 16S рНК использовали программу ClustalW2, а для филогенетического анализа – программу MEGA, версия 5.2.

Для сравнительных экспериментов использовали штамм *Bacillus* sp. 3М (ВКПМ В-10130), выделенный из мерзлых пород Якутии и предоставленный сотрудниками Тюменского научного центра СО РАН [Брушков и др., 2009].

Бактериальные штаммы *Bacillus* sp. выращивали на качалке (180 об/мин) в колбах Эрленмейера объемом 100 мл с 50 мл питательной среды. Культивирование вели на питательной среде следующей

го состава (г/л): K_2HPO_4 – 1.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.5; $(NH_4)_2SO_4$ – 2.0; пептон – 2.0; дрожжевой экстракт – 5.0; глицерин – 5.0. Для засева использовали суточную культуру, выращенную на среде такого же состава. Температуру культивирования 22 и 45 °C поддерживали на термостатируемой качалке BioSan ES-20 (Латвия). Культивирование осуществляли при 5 °C в холодильной камере Polair (Россия). Пробы отбирали через каждый час выращивания при температуре 22 °C (45 °C) и через каждые 3 ч при 5 °C, затем определяли оптическую плотность клеточной суспензии на спектрофотометре UNICO-2800 при 540 нм, толщина кюветы 10 мм. Кинетические параметры периодического роста микроорганизмов определяли согласно рекомендациям из [Перм, 1978].

Все штаммы рода *Bacillus* исследовали на потенциальное наличие таких ферментативных активностей, как каталазная, дегидрогеназная, протеазная, амилазная и липазная.

Активность ферментов определяли в культуральной жидкости турбидиметрическим методом. Уровень активности каталазы оценивали по методу [Королюк и др., 1988], основанному на способности H_2O_2 образовывать с молибдатом аммония окрашенный комплекс, имеющий максимум поглощения при 405 нм. Определение дегидрогеназной активности проводили модифицированным методом [Романенко, Кузнецов, 1974], основанным на способности дегидрогеназ восстанавливать за счет дегидрирования 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) до 2,3,5-трифенилформазана (ТФФ), имеющего темно-красный цвет. Количество образовавшегося формазана определяли по оптической плотности на спектрофотометре (485 нм). Протеолитическую активность определяли методом [Pant et al., 2015], основанным на учете количества аминокислот, образующихся при протеолизе внесенных в пробу белков путем связывания их в окрашенные комплексы. Для определения амилолитической активности применяли метод Смита и Роя в модификации Маннинга и Кемпбелла [Нетрусов и др., 2005]. Метод основан на колориметрическом определении скорости измерения окраски с йодом на спектрофотометре при 620 нм. Липолитическую активность определяли титриметрическим методом, в качестве субстрата использовали оливковое масло [Грачева и др., 1982]. Метод основан на титровании щелочью свободных жирных кислот, образующихся из оливкового масла в результате действия фермента. Определение белка в культуральной жидкости проводили по методу Бредфорда [Bradford, 1976]. Все измерения были выполнены с трехкратной повторностью. Математическую обработку опытных данных осуществляли с использованием программного средства для анализа данных и визуализации R, версия 3.2.0 (Free Software Foundation, Inc Boston, MA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

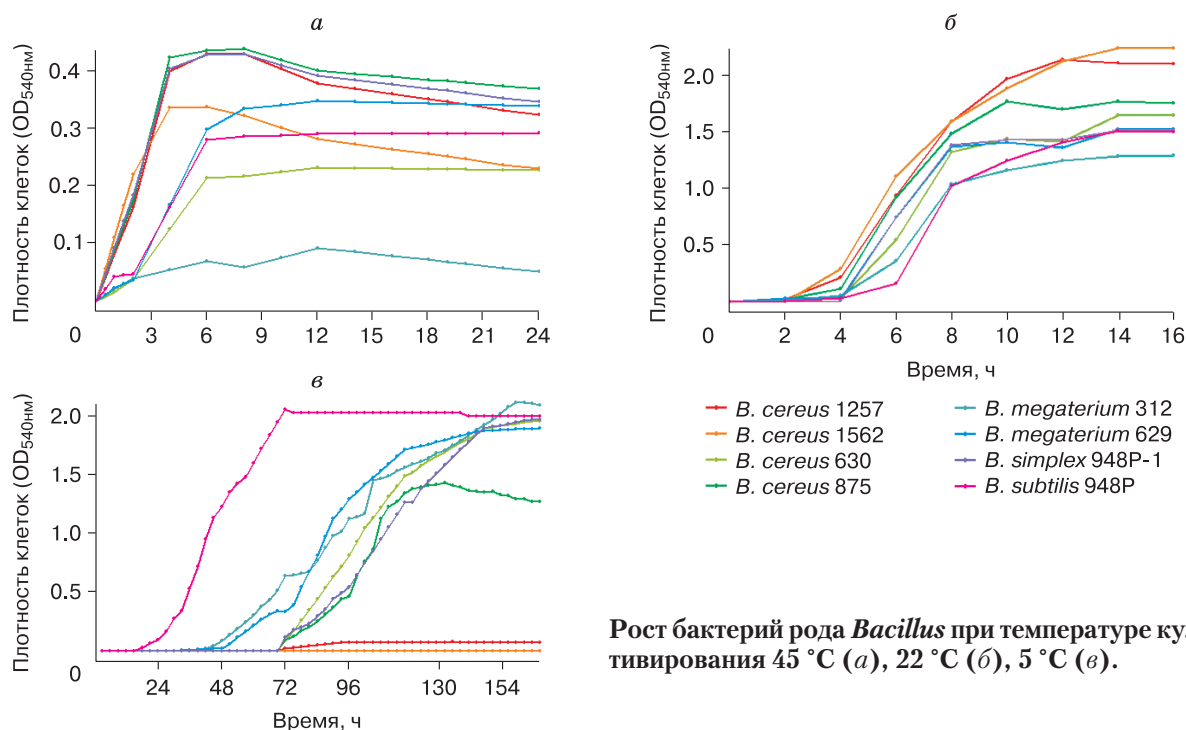
Штаммы бактерий, выделенные из мерзлых пород, были идентифицированы и отнесены к видам *B. megaterium* (3 шт.), *B. cereus* (4 шт.), *B. simplex* (1 шт.) и *B. subtilis* (1 шт.). По результатам филогенетического анализа штаммов 1562 TS, 875 TS, 1257 TS и 630 TS установлено, что ближайшими родственниками вида является *B. cereus* со сходством 99 %. Выявлено, что штаммы 206 TS, 312 TS и 629 TS генетически близки к *B. megaterium* со сходством 97, 99 и 98 % соответственно. Ближайшим соседом штамма 948P-1 TS является *B. simplex*, а штамма 948P TS – *B. subtilis* со сходством 99 и 98 % соответственно (табл. 1).

Влияние температуры культивирования на параметры роста штаммов рода *Bacillus* были оценены в простых периодических условиях с использованием посевного материала – клеток из лаг-фазы, тем самым минуя фазу прорастания спор. Известно, что периодическая культура бактерий в своем развитии проходит четыре основные фазы: лаг-фазу (адаптация к новой среде), экспоненциальную (увеличение скорости роста), стационарную (снижение скорости роста) и фазу отмирания (дегенерация популяции). Синтез бактериями вторичных метаболитов возрастает в конце экспоненциальной фазы и достигает максимума в стационарной фазе [Timmusk et al., 1999].

Результаты исследований показали, что отношение к температуре у изучаемых штаммов неодинаковое. Рост клеток начинался сразу после засева, продолжительность лаг-фазы колебалась от 30 мин до 4 ч в зависимости от температуры культивирования.

Таблица 1. Результаты идентификации культивируемых бактерий, выделенных из мерзлых пород Западной Сибири (месторождение Дремучее)

Номер скважины	Глубина, м	Штамм	Таксономическое положение	Сходство 16SpPHK, %
1	2.5	1562 TS	<i>Bacillus cereus</i>	99
	2.5	875 TS	<i>Bacillus cereus</i>	99
	10.0	206 TS	<i>Bacillus megaterium</i>	97
	30.3	1257 TS	<i>Bacillus cereus</i>	99
2	4.2	312 TS	<i>Bacillus megaterium</i>	99
	10.0	629 TS	<i>Bacillus megaterium</i>	98
	10.0	630 TS	<i>Bacillus cereus</i>	99
	12.3	948-P1 TS	<i>Bacillus simplex</i>	99
	12.3	948P TS	<i>Bacillus subtilis</i>	98



Рост бактерий рода *Bacillus* при температуре культивирования 45 °С (а), 22 °С (б), 5 °С (в).

При 45 °С у большинства культур продолжительность лаг-фазы составляла 30 мин, после чего отмечался интенсивный рост бактериальных штаммов в течение 3,5 ч и к 4 ч культуры переходили в стационарную фазу развития (см. рисунок, а).

Выращивание культур при 22 °С способствовало удлинению лаг-фазы на 2–4 ч. Экспоненциальная фаза роста отмечалась через 4–6 ч и в среднем продолжалась 3,7 ч. Фаза стационарного роста исследуемых культур достигалась через 10–12 ч культивирования (см. рисунок, б). К этому времени наблюдалось значительное накопление биомассы – почти в 4 раза больше, чем при 45 °С, о чем свидетельствуют результаты измерения оптической плотности.

Согласно результатам исследований, при температуре культивирования 5 °С наблюдалось замедление роста культур по всем фазам. Лаг-фаза у большинства культур продолжалась от 15 до 68 ч, что свидетельствует о более длительном адаптационном периоде. Экспоненциальная фаза роста продолжалась в среднем от 27 до 117 ч. Стационарная фаза отмечалась уже после 72 ч, максимальная плотность клеток наблюдалась у *B. simplex* 948P1 и *B. megaterium* 312 (см. рисунок, в).

На основе полученных данных для исследуемых штаммов были рассчитаны следующие кинетические параметры роста: μ (удельная скорость роста клеточной культуры) и g (время генерации). Для сравнения исследуемых штаммов в табл. 2

Таблица 2. Кинетические параметры роста штаммов рода *Bacillus* при различных температурах культивирования (Т)

Штамм	Т = 5 °С			Т = 22 °С			Т = 45 °С		
	μ	g	ПК _{max}	μ	g	ПК _{max}	μ	g	ПК _{max}
<i>B. cereus</i> 875	0.064	10.828	1.427	0.641	1.081	1.765	0.676	1.025	0.438
<i>B. cereus</i> 1257	0.055	12.600	0.072	0.372	1.862	2.132	0.657	1.054	0.430
<i>B. cereus</i> 1562	–	–	0.000	0.505	1.372	2.231	0.517	1.340	0.338
<i>B. megaterium</i> 206	0.040	17.325	1.962	0.682	1.019	1.269	0.906	0.764	0.293
<i>B. megaterium</i> 312	0.034	20.382	2.102	0.529	1.310	1.284	0.185	3.745	0.092
<i>B. cereus</i> 630	0.063	11.002	1.945	0.946	0.756	1.640	0.433	1.600	0.232
<i>B. subtilis</i> 948P	0.034	20.382	1.459	0.915	0.757	1.502	0.451	1.536	0.292
<i>B. megaterium</i> 629	0.063	11.001	1.945	1.000	0.693	1.520	0.529	1.310	0.348
<i>B. simplex</i> 948P-1	0.082	8.6620	2.02	1.362	0.509	1.508	0.453	1.529	0.430

Пр и м е ч а н и е. μ – удельная скорость роста клеточной культуры, ч⁻¹; g – время генерации клетки, ч; ПК_{max} – максимальная плотность клеток бактерий в суспензии (OD_{540 нм}).

представлены результаты параметров роста. Из приведенных данных видно, что исследуемые культуры различаются по скорости роста. Наиболее высоким значением μ характеризуется штамм *B. simplex* 948P-1 при температуре культивирования 22 °С, наименьшим – *B. megaterium* 312 и *B. subtilis* 948P при 5 °С, средние величины $\mu = 0.048 \text{ ч}^{-1}$, $g = 12.1 \text{ ч}$. Например, время генерации антарктического штамма *Pseudoalteromonas haloplanktis* составляет 4 ч при температуре культивирования 4 °С [Piette et al., 2011], а у *Psychromonas ingrahamii*, выделенного из морского льда Арктики, время генерации составляло 12 ч при 5 °С [Rivkina et al., 2000]. Высокая скорость роста и продолжительное время генерации были отмечены и у микроорганизмов при температуре выращивания 45 °С, при этом накопление биомассы было на сравнительно низком уровне.

Таким образом, рост бактериальных штаммов рода *Bacillus* зависит от температуры культивирования. Выявленные закономерности роста микроорганизмов позволили выделить оптимальные температуры культивирования, при которых обеспечивается наибольшая продуктивность процесса. Установлено, что максимальная плотность клеток достигалась при температуре 5 и 22 °С, однако при 5 °С требовалось более длительное время для достижения максимальной плотности клеток. Культивирование штаммов при 45 °С не сопровождалось существенным приростом биомассы.

Ранее считалось, что *B. cereus* является мезофилом, но последние исследования показали, что обнаружены и психротрофные формы штамма *B. cereus*, способные к росту в температурном диапазоне 7–30 °С [Francis et al., 1998; Montanhini et al., 2013]. Наши результаты показали психротрофную природу штаммов *B. cereus* 875, *B. cereus* 1257, *B. cereus* 630.

Синтез белка бактериями зависит от природы лимитирующих рост факторов внешней среды. Одним из важных факторов является температура, оказывающая большое влияние на накопление биомассы и интенсивность протекания обмена веществ в клетке.

Максимальное содержание белка в культуральной жидкости при температуре культивирования 22 °С отмечено у штаммов вида *B. megaterium* 206 (21.45 мкг/мл) и *B. cereus* 1562 (21.42 мкг/мл). Выращивание культур при температуре 45 °С привело к снижению синтеза белка, и его содержание в культуральной жидкости в среднем составляло 4.06 мкг/мл. При более низких температурах культивирования (5 °С) максимальное количество белка отмечено у штаммов *B. simplex* 948P-1 (25.80 мкг/мл), *B. subtilis* 948P (16.80 мкг/мл) и *Bacillus* sp. 3М (13.35 мкг/мл). Следует отметить, что количество белка в культуральной жидкости коррелировало с накоплением биомассы.

Результаты изучения влияния температурного фактора на ферментативную активность бактериальных штаммов рода *Bacillus* представлены в табл. 3.

Реакция большинства организмов на действие экстремальных факторов проявляется в повышении активности ферментов антиоксидантной защиты. Одним из способов сохранения активной жизнедеятельности в условиях низких положительных и отрицательных температур – высокая каталазная активность микроорганизмов. Принято считать, что каталаза – это психрофильный фермент, характеризующийся высокой активностью в температурном диапазоне от 0 до 30 °С [Gerday et al., 1997].

Каталазная активность изученных штаммов при температуре 45 °С варьировала от 0.73 до 12.35 ед./мг белка, а при температуре 22 °С уровень каталазы варьировал от 0.62 до 14.16 ед./мг белка. Каталазная активность у культур, выращенных при 5 °С, была в несколько раз выше, чем при 45 и 22 °С, и в среднем варьировала от 10.46 до 26.79 ед./мг белка соответственно. Усиление каталазной активности при низких положительных температурах является общей закономерностью для психроактивных микроорганизмов [Frank et al., 1963; Yumoto et al., 2000; Kimoto et al., 2012].

Рост психрофильных и психротолерантных микроорганизмов при низких положительных и отрицательных температурах связан с возрастанием энергетических потребностей, что является “сигналом” для синтеза дегидрогеназ, участвующих в процессе дегидрирования, сопряженного с синтезом аденозинтрифосфата – основного аккумулятора энергии в клетке [Takada et al., 1981]. При изучении динамики изменения дегидрогеназной активности у исследуемых штаммов рода *Bacillus* выявлено, что максимальная активность фермента наблюдалась при температуре культивирования 5 °С (0.165 мг/(мл·сут)), при 22 °С в среднем составляла 0.112 мг/(мл·сут), а при 45 °С равна 0.005 мг/(мл·сут) (см. табл. 3). Оптимальные температуры для каталитической активности дегидрогеназ у исследованных штаммов составляют 5 и 22 °С, что характерно для ферментов холодаадаптированных бактерий.

Полученные результаты показали, что все исследованные штаммы бактерий обладают липолитической (экзолипазной) активностью (см. табл. 3). Авторами установлено, что наибольшая активность наблюдалась при температуре 5 °С и достигала 0.800–3.042 мкмоль/(мл·мин). При этом максимум ферментообразования отмечен у штаммов *B. cereus* 630 (3.04 мкмоль/(мл·мин)), *B. cereus* 875 (2.66 мкмоль/(мл·мин)) и *B. simplex* 948P-1 (2.62 мкмоль/(мл·мин)). Липолитическая активность у исследованных штаммов, выращенных при 22 °С, варьировала от 0.360 до

Таблица 3. Ферментативная активность исследуемых бактериальных штаммов рода *Bacillus*

Штамм	Температура, °С	Каталаза (ед./мг белка)	Дегидрогеназа (мг/(мл·сут))	Липаза (мкмоль/(мл·мин))	α-амилаза (ед./(мл·мин))	Протеаза (ед./(мл·30 мин))	Белок (мкг/мл)
<i>B. cereus</i> 630	5	21.49 ± 2.36	0.21 ± 0.01	3.04 ± 0.28	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	108.36 ± 16.36
	22	9.73 ± 0.99	0.13 ± 0.01	0.74 ± 0.07	0.28 ± 0.02	0.12 ± 0.01	118.29 ± 17.86
	45	9.13 ± 0.82	0.01 ± 0.00	0.41 ± 0.04	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	78.64 ± 12.03
<i>B. cereus</i> 875	5	11.64 ± 1.20	0.15 ± 0.01	2.66 ± 0.28	0.39 ± 0.02	0.17 ± 0.02	223.06 ± 35.02
	22	4.57 ± 0.50	0.09 ± 0.01	1.22 ± 0.12	0.24 ± 0.01	0.20 ± 0.02	92.01 ± 14.63
	45	12.35 ± 1.36	0.01 ± 0.00	0.36 ± 0.04	0.02 ± 0.00	0.05 ± 0.01	94.27 ± 14.42
<i>B. cereus</i> 1257	5	23.07 ± 2.08	0.11 ± 0.01	1.53 ± 0.16	0.24 ± 0.01	0.08 ± 0.01	94.73 ± 14.87
	22	0.62 ± 0.06	0.18 ± 0.01	0.94 ± 0.10	0.09 ± 0.00	0.10 ± 0.01	62.30 ± 9.84
	45	3.86 ± 0.31	0.01 ± 0.00	0.54 ± 0.05	0.03 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<i>B. cereus</i> 1562	5	10.46 ± 1.15	0.15 ± 0.01	0.83 ± 0.08	0.08 ± 0.00	0.06 ± 0.01	129.27 ± 19.64
	22	3.82 ± 0.39	0.09 ± 0.01	1.21 ± 0.11	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.01	118.21 ± 18.80
	45	6.43 ± 0.45	0.01 ± 0.00	0.85 ± 0.08	0.06 ± 0.00	0.17 ± 0.02	85.48 ± 13.85
<i>B. megaterium</i> 312	5	20.58 ± 2.02	0.26 ± 0.02	1.46 ± 0.13	0.08 ± 0.00	0.01 ± 0.00	97.76 ± 14.18
	22	10.62 ± 0.85	0.30 ± 0.02	1.33 ± 0.12	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.02	76.55 ± 11.41
	45	12.24 ± 1.35	0.00 ± 0.00	0.45 ± 0.04	0.23 ± 0.01	0.07 ± 0.01	88.67 ± 12.59
<i>B. megaterium</i> 629	5	14.49 ± 0.72	0.08 ± 0.01	1.40 ± 0.12	0.32 ± 0.02	0.00 ± 0.00	67.45 ± 10.86
	22	4.34 ± 0.39	0.16 ± 0.01	0.70 ± 0.06	0.11 ± 0.00	0.01 ± 0.00	114.12 ± 18.15
	45	2.14 ± 0.22	0.00 ± 0.00	0.95 ± 0.09	0.03 ± 0.00	0.10 ± 0.01	73.82 ± 11.22
<i>B. megaterium</i> 206	5	26.79 ± 2.95	0.18 ± 0.01	2.21 ± 0.22	0.17 ± 0.01	0.14 ± 0.02	102.30 ± 15.14
	22	3.06 ± 0.28	0.08 ± 0.01	2.00 ± 0.22	0.05 ± 0.00	0.34 ± 0.04	67.76 ± 10.91
	45	7.65 ± 0.73	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.10 ± 0.01	96.85 ± 15.79
<i>B. subtilis</i> 948P	5	17.44 ± 1.92	0.15 ± 0.01	2.16 ± 0.22	0.06 ± 0.00	0.09 ± 0.01	125.03 ± 19.75
	22	5.87 ± 0.60	0.05 ± 0.00	1.80 ± 0.16	0.05 ± 0.00	0.22 ± 0.02	127.15 ± 20.09
	45	5.63 ± 0.61	0.01 ± 0.00	1.75 ± 0.18	0.04 ± 0.00	0.01 ± 0.00	84.12 ± 13.21
<i>B. simplex</i> 948P-1	5	21.44 ± 2.36	0.33 ± 0.03	2.63 ± 0.28	0.12 ± 0.01	0.20 ± 0.02	114.27 ± 17.21
	22	7.82 ± 0.66	0.03 ± 0.00	0.36 ± 0.04	0.13 ± 0.01	0.09 ± 0.01	150.18 ± 24.18
	45	0.73 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.55 ± 0.05	0.06 ± 0.00	0.08 ± 0.01	60.94 ± 8.90
<i>Bacillus</i> sp. B-10130	5	18.13 ± 1.60	0.06 ± 0.00	1.72 ± 0.14	0.18 ± 0.01	0.09 ± 0.01	168.67 ± 24.96
	22	14.16 ± 1.50	0.03 ± 0.00	1.53 ± 0.12	0.14 ± 0.01	0.25 ± 0.03	98.42 ± 14.66
	45	2.94 ± 0.29	0.00 ± 0.00	0.56 ± 0.05	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	51.24 ± 7.22

2.000 мкмоль/(мл·мин), тогда как при 45 °С составляла 0.001–0.014 мкмоль/(мл·мин). Установлено, что при 5 и 22 °С высокой липазной активностью отличались штаммы, относящиеся к виду *B. cereus*. Отмечена зависимость продукции экзолипаз от видовой принадлежности штаммов, так, среди культур высокой липазной активностью при 5 °С характеризовались штаммы *B. cereus*, а при 22 °С штаммы *B. megaterium* и *B. subtilis*.

Способность психрофильных и психротрофных бактерий продуцировать холодоактивные амилазы при низких температурах позволяет поддерживать текучесть и пластичность мембраны, тем самым обеспечивая поддержание ионного и молекулярного состава клетки [Hébraud, Potier, 1999].

Максимальный синтез α-амилазы наблюдается при температуре 5 °С штаммами *B. cereus* 875 (0.39 ед./(мл·мин)), *B. megaterium* 629 (0.32 ед./(мл·мин)), *B. cereus* 1257

(0.24 ед./(мл·мин)) и при 22 °С – штаммами *B. cereus* 630 (0.28 ед./(мл·мин)) и *B. cereus* 875 (0.24 ед./(мл·мин)) (см. табл. 3). При более высокой температуре (45 °С) культивирования резко понижалась активность α-амилазы (0.02–0.06 ед./(мл·мин)). В работах [Kuddus et al., 2011, 2012] показана аналогичная зависимость активности α-амилазы у бактериальных штаммов, выделенных из низкотемпературных мест обитания, где максимальная активность наблюдалась при 20 °С, а с повышением температуры культивирования более 20 °С ферментативная активность снижалась и полностью отсутствовала при 50 °С.

Активность протеаз определяли в поздней стационарной фазе исходя из сведений, полученных ранее при изучении характера роста и синтеза экзопротеаз [Dube et al., 2001]. Протеазы психрофильных и психротрофных микроорганизмов отличаются высокой каталитической активностью при низких и умеренных температурах по сравне-

нию с мезофилами. Высокая активность протеаз является общей закономерностью в приспособлении микробиоты к низким температурам окружающей среды путем поддержания текучести мембраны и участия холодоспецифических протеаз в распознавании и разрушении денатурированных белков, накопление которых ведет к гибели клетки [Potier et al., 1990].

Высокая протеазная активность отмечена при 22 °С у *B. megaterium* 206 (0.34 ед./мл·30 мин), *Bacillus* sp. 3М (0.25 ед./мл·30 мин) и *B. subtilis* 948Р (0.22 ед./мл·30 мин). При температуре культивирования 5 °С максимальная активность отмечена у штаммов *B. simplex* 948Р-1 (0.20 ед./мл·30 мин), *B. cereus* 875 (0.17 ед./мл·30 мин) и *B. cereus* 1562 (0.16 ед./мл·30 мин) (см. табл. 3). Проанализировав результаты, полученные в ходе исследования, и сравнив с имеющимися литературными данными по протеазной активности микроорганизмов из холодных мест обитания, можно сделать вывод о смещении температурного оптимума активности в сторону низких температур (по сравнению с мезофильными штаммами). Таким образом, протеазы психрофильных и психротолерантных бактерий имеют температурный диапазон от 0 до 30 °С, при повышении температуры синтез фермента снижается [Vazquez et al., 2004; Struway, Feller, 2012; Fornbacke, Clarsund, 2013].

ВЫВОДЫ

В результате исследований установлено, что оптимальными для роста бактериальных штаммов рода *Bacillus* являются температуры 5 и 22 °С, что указывает на психротолерантный характер изолятов и возможность их существования и размножения в широком диапазоне температур. Универсальным механизмом приспособления для жизнедеятельности в условиях низких положительных и отрицательных температур является активный синтез специфических ферментов. Ферменты, обладающие высокой активностью при низких положительных температурах, позволяют компенсировать нарушения клеточного метаболизма, что, в свою очередь, позволяет бактериальной клетке продолжать рост, но с меньшей скоростью. Экспериментальными данными подтверждено увеличение ферментативной активности у большинства исследуемых штаммов рода *Bacillus* при низких положительных температурах.

Полученные результаты расширяют представления о пределах толерантности для роста и ферментативной активности микробиоты из мерзлоты к действию температурного фактора и о потенциальных возможностях использования полученных изолятов в прикладных биотехнологических исследованиях.

Работа выполнена в рамках госзадания Министрства образования и науки РФ (№6.3394.2017/П4).

Литература

- Брушков А.В., Мельников В.П., Суховой Ю.Г. и др.** Реликтовые микроорганизмы криолитозоны как возможные объекты геронтологии // Успехи геронтологии, 2009, т. 22, № 2, с. 253–258.
- Brouchkov, A.V., Melnikov, V.P., Sukhovei, Yu.G., et al., 2009. Relict microorganisms in permafrost as possible objects of gerontological research. Uspekhi Gerontologii 22 (2), 253–258.
- Гиличинский Д.А., Звягинцев Д.Г., Кудрявцева Н.Н., Воробьева Е.А.** Микробиологический подход к изучению развития мерзлых толщ // Геокриологические исслед., 1989, т. 23, с. 221–231.
- Gilichinsky, D.A., Zvyagintsev, D.G., Kudryavtseva, N.N., Vorobieva, E.A., 1989. The microbiological approach to permafrost studies. Geokriologicheskie Issledovaniya 23, 221–231.
- Грачева И.М.** Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов / И.М. Грачева, Ю.П. Грачев, М.С. Мосичев и др. М., Легкая и пищевая пром-сть, 1982, 240 с.
- Gracheva, I.M., Grachev, Yu.P., Mosichev, M.S., et al., 1982. Laboratory Practice on Enzyme Preparation Technology. Legkaya i Pishchevaya Promyshlennost', Moscow, 240 pp. (in Russian)
- Доманская О.В., Доманский В.О., Кулакова А.Ю.** Исследование микробиологической и биохимической активности мерзлых отложений Западной Сибири // Соврем. пробл. науки и образования, 2015, № 5. – URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21761> (дата обращения: 18.08.2016).
- Domanskaya, O.V., Domanskiy, V.O., Kulakova, A.Yu., 2015. Microbiological and biochemical activity of permafrost in West Siberia. Sovremennye Problemy Nauki i Obrazovaniya, No. 5. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21761> (submittal date: 18.08.2016).
- Звягинцев Д.Г., Гиличинский Д.А., Хлебникова Г.М. и др.** Сравнительная характеристика микробных сообществ многолетнемерзлых пород различного возраста и генезиса // Микробиология, 1990, т. 59, вып. 3, с. 491–498.
- Zvyagintsev, D.G., Gilichinsky, D.A., Khlebnikova, G.M., et al., 1990. Microbial communities in permafrost: Comparative analysis. Mikrobiologiya 59 (3), 491–498.
- Королюк М.А., Иванова Л.И., Майоров И.Г., Токарев В.Е.** Методы определения активности каталазы // Лаб. дело, 1988, № 1, с. 16–18.
- Koroluk, M.A., Ivanova, L.I., Mayorov, I.G., Tokarev, V.E., 1988. Methods for determination of catalase activity. Laboratornoye Delo, No. 1, 16–18.
- Мельников В.П.** Новейшие явления, концепции, инструментарий как фундамент для старта к новым горизонтам криологии // Криосфера Земли, 2012, т. XVI, № 4, с. 3–9.
- Melnikov, V.P., 2012. Recent discoveries, theories, and tools: making a start toward new prospects in cryology. Earth's Cryosphere, XVI (4), 3–9. (in Russian)
- Мельников В.П., Геннадиник В.Б.** Криософия – система представлений о холодном мире // Криосфера Земли, 2011, т. XV, № 4, с. 3–8.
- Melnikov, V.P., Gennadinik, V.B., 2011. Cryosophy: An outlook of the cold world. Earth's Cryosphere XV (4), 3–8. (in Russian)

- Нетрусов А.И.** Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. М., Издат. центр "Академия", 2005, 608 с.
 Netrusov, A.I., Egorova, M.A., Zakharchuk, L.M., et al., 2005. Practice in Microbiology. Akademiya, Moscow, 608 pp. (in Russian)
- Перт С.Дж.** Основы культивирования микроорганизмов и клеток / С.Дж. Перт; Под ред. И.Л. Работновой. М., Мир, 1978, 321 с.
 Pirt, S.J., 1975. Principles of Microbe and Cell Cultivation. Halsted Press, Division of John Wiley and Sons, New York, 274 pp.
- Петровская Л.Е., Новотоцкая-Власова К.А., Спирина Е.В. и др.** Липолитические ферменты микроорганизмов из криопягов вечной мерзлоты // Докл. РАН, 2012, т. 445, № 1, с. 102–105.
 Petrovskaya, L.E., Novototskaya-Vlasova, K.A., Spirina, E.V., et al., 2012. Lipase activity in microorganisms from permafrost cryopegs. Dokl. RAN, 445 (1), 102–105.
- Романенко В.И.** Экология микроорганизмов пресных водоемов: лабораторное руководство / В.И. Романенко, С.И. Кузнецов. Л., Наука, 1974, 61 с.
 Romanenko, V.I., Kuznetsov, S.I., 1974. Ecology of Freshwater Microorganisms. Nauka, Leningrad, 61 pp. (in Russian)
- Baraúna, R.A., Freitas, D.Y., Pinheiro, J.C., Follador, A.R.C., Silva, A.A.** Proteomic perspective on the bacterial adaptation to cold: integrating OMICs data of the psychrotrophic bacterium *Exiguobacterium antarcticum* B7 // Proteomes, 2017, vol. 5, No. 9, 11 p.
- Bowman, J.P., Guy, C.J., Mancuso, N.C.A.** Psychrophilic extremophiles from Antarctica: Biodiversity and Biotechnologica Potential // Ocean and Polar Res., 2005, vol. 27, No. 2, p. 221–230.
- Bradford, M.M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganisms qualities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry, 1976, vol. 72, p. 248–254.
- Cameron, R.E.** Microbial and ecological in visitations in Victoria Valley, Southern Victoria Land, Antarctica // Antarctica Res. Ser., 1972, vol. 20, p. 195–260.
- Coker, J.A.** Extremophiles and biotechnology: current uses and prospects // F1000Research, 2016, vol. 5, 7 p.
- D'Amico, S., Claverie, P., Collins, T., et al.** Molecular basis of cold adaptation // Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci., 2002, vol. 357, p. 917–925.
- Dube, S., Singh, L., Alam, S.I.** Proteolytic anaerobic bacteria from lake sediments of Antarctica // Enzyme Microb. Technol., 2001, vol. 28, p. 114–121.
- Feller, G.** Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology // Hindawi Publishing Corporation Scientifica, 2013, vol. 2013, 28 p. – URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/512840> (дата обращения: 18.07.2016).
- Fornbacke, M., Clarsund, M.** Cold-adapted proteases as an emerging Class of therapeutics // Infect. Dis. Ther., 2013, vol. 2, No. 1, p. 15–26.
- Frank, H.A., Ishibashi, S.T., Reid, A., Ito, J.S.** Catalase activity of psychrophilic bacteria grown at 2 °C and at 30 °C // Appl. Microbiol., 1963, vol. 11, p. 151–153.
- Francis, K.P., Mayr, R., Stetten, F., Stewart, G., Scherer, S.** Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes // Appl. Environ. Microbiol., 1998, p. 3525–3529.
- Gesheva, V., Vasileva-Tonkova, E.** Production of enzymes and antimicrobial compounds by halophilic Antarctic *Nocardia oides* sp. grown on different carbon sources // World J. Microbiol. Biotechnol., 2012, vol. 28, p. 2069–2076.
- Gerday, C., Aittaleb, M., Arpigny, J. L., et al.** Psychrophilic enzyme: a thermodynamic challenge // Biochim. Biophys. Acta, 1997, vol. 1342, p. 119–131.
- Gome, J., Steiner, W.** Extremophiles and Extremozymes // Food Technol. Biotechnol., 2004, vol. 42, No. 4, p. 223–235.
- Hansen, A.A., Herbert, R.A., Mikkelsen, K.** Viability, diversity and composition of the bacterial community in a high Arctic permafrost soil from Spitsbergen, Northern Norway // Environ. Microbiol., 2007, vol. 28, p. 70–84.
- Hébraud, M., Potier, P.** Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria // J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 1999, vol. 1, No. 2, p. 211–219.
- Joshi, S., Satyanarayana, T.** Biotechnology of Cold-Active Proteases // Biology, 2013, vol. 2, p. 755–783.
- Kasana, R.C.** Proteases from psychrotrophs: an overview // Crit. Rev. Microbiol., 2010, vol. 36, No. 2, p. 134–145.
- Kimoto, H., Yoshimune, K., Matsuymaand, H., Yumoto, I.** Characterization of catalase from psychrotolerant *Psychrobacter piscatorii* T-3 exhibiting high catalase activity // Intern. J. Mol. Sci., 2012, vol. 13, p. 1733–1746.
- Konsoula, Z., Liakopoulou-Kyriakides, M.** Co-production of alpha-amylase and beta-galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates // Bioresour. Technol., 2007, vol. 98, p. 150–157.
- Kuddus, M., Roohi, R., Arif, J.M., Ramteke, P.W.** An overview of cold-active microbial α -amylase: adaptation strategies and biotechnological potentials // Biotechnology, 2011, vol. 10, p. 246–258.
- Kuddus, M., Roohi, R., Saima, S., Ahmad, I.Z.** Cold-active extracellular α -amylase production from novel bacteria *Microbacterium foliorum* GA2 and *Bacillus cereus* GA6 isolated from Gangotri glacier, Western Himalaya // J. Genetic Eng. and Biotechnol., 2012, vol. 10, No. 1, p. 151–159.
- MacElroy, R.D.** Some comments on the evolution of extremophiles // Biosystems, 1974, No. 6, p. 74–75.
- Maiangwa, J., Ali, M.S., Salleh, A.B., et al.** Adaptational properties and applications of cold-active lipases from psychrophilic bacteria // Extremophiles, 2015, vol. 19, No. 2, p. 235–247.
- Montanhini, M.T.M., Montanhini, R.N., Pinto, J.P.N., Bersot, L.S.** Effect of temperature on the lipolytic and proteolytic activity of *Bacillus cereus* isolated from dairy products // Intern. Food Res. J., 2013, vol. 20, No. 3, p. 1417–1420.
- Nikrad, M.P., Kerkhof, L.J., Haggblom, M.M.** The subzero microbiome: microbial activity in frozen and thawing soils // FEMS Microbiol. Ecology, 2016, vol. 92, p. 16. – URL: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw08> (дата обращения: 10.02.2016).
- Pant, G., Prakash, A., Pavani, J.V.P., Bera, S., et al.** Production optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis* // J. Taibah Univ. for Science, 2015, vol. 9, p. 50–55.
- Piette, F., D'Amico, S., Mazzucchelli, G., et al.** Life in the Cold: a proteomic study of cold-repressed proteins in the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 // Appl. Environ. Microbiol., 2011, vol. 77, No. 11, p. 3881–3883.
- Potier, P., Drevet, P., Gounot, A.M., Hipkiss, A.R.** Temperature dependant changes in proteolytic activities and protein composition in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis* S1/55 // J. Gen. Microbiol., 1990, vol. 136, p. 283–291.

- Rivkina, E.M., Friedmann, E.I., McKay, C.P., Gilichinsky, D.A.** Metabolic activity of permafrost bacteria below the freezing point // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, vol. 66, p. 3230–3233.
- Stan-Lotter, H., Fendrihan, S.** Adaption of microbial life to environmental extremes. Wien, New York, Springer, 2011, 284 p.
- Struvay, C., Feller, G.** Optimization to Low Temperature Activity in Psychrophilic Enzymes // *Intern. J. Mol. Sci.*, 2012, vol. 13, No. 9, p. 11643–11665.
- Takada, Y., Fukunaga, N., Sasaki, S.** Temperature-dependence and distribution of NADH dehydrogenase in psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. strain ABE-1 // *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1981, vol. 27, p. 327–337.
- Timmusk, S., Nicander, B., Granhall, U., Tillberg, E.** Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa* // *Soil Biol. Biochem.*, 1999, vol. 31, p. 1847–1852.
- Vazquez, S., Coriab, S.H., Mac Cormack, W.P.** Extracellular proteases from eight psychrotolerant Antarctic strains // *Microbiol. Res.*, 2004, vol. 159, No. 2, p. 157–166.
- Vester, J., Glaring, M., Stougaard, P.** Discovery of novel enzymes with industrial potential from a cold and alkaline environment by a combination of functional metagenomics and culturing // *Microbial Cell Factories*, 2014, vol. 13, No. 72, 14 p. – URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/512840> (дата обращения: 23.08.2016).
- Vorobyova, E.A., Soina, V., Gorlenko, M., et al.** The deep cold biosphere: facts and hypothesis // *FEMS Microbiol. Rev.*, 1997, vol. 20, p. 277–290.
- Yumoto, I., Ichihashi, D., Iwata, H., et al.** Purification and characterization of a catalase from the facultatively psychrophilic bacterium *Vibrio rumoiensis* S-1^T exhibiting high catalase activity // *J. Bacteriol.*, 2000, vol. 182, No. 7, p. 1903–1909.
URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения: 22.09.2014).

Поступила в редакцию
5 сентября 2016 г.