

Калитина Е. Г., канд. биол. наук; н. с.
Геологический институт ДВО РАН
Елиусизова А. Б., инженер по охране окружающей среды
ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии г. Владивосток

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ СРЕДЫ И ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ ШТАММОВ НА СИНТЕЗ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ, ИЗОЛИРОВАННЫМИ ИЗ БУХТЫ ЗОЛОТОЙ РОГ Г. ВЛАДИВОСТОКА

microbiol@mail.ru

В работе показано, что температура + 22° С способствовала наибольшему синтезу гидролитических ферментов у микроорганизмов, минимальная ферментативная активность бактерий отмечена при низкой температуре. Также выявлено, что поллютанты стимулировали липазную активность лишь у единичных штаммов. Установлено, что длительное хранение микробных штаммов способствует постепенному снижению ферментативной активности у микроорганизмов.

Ключевые слова: самоочищение среды, микроорганизмы, гидролитические ферменты, загрязненные акватории, тяжелые металлы.

Одной из наиболее загрязненных морских акваторий в Приморье, испытывающих комплексное влияние от поступления разнообразных загрязнителей, является бухта Золотой Рог, расположенная в центре г. Владивостока. Ежегодные объемы стоков в бухту в несколько раз превышают объем воды в ее акватории [1]. Воды бухты характеризуются одновременным присутствием как органических соединений, которые могут легко подвергаться гидролизу так и токсических веществ – труднорастворимых углеводородов, фенолов, тяжелых металлов, пестицидов [2]. Все эти факторы могут влиять на интенсивность синтеза гидролаз и активность экзогенных ферментов микроорганизмов, а значит на скорость и эффективность процессов самоочищения загрязненной среды. Однако, до настоящего времени в б. Золотой Рог подобных исследований проведено не было, изучено лишь распределение численности гидролитически активной микрофлоры в морской акватории [3]. Учет влияния факторов среды на синтез ферментов микроорганизмами важен для понимания способности микробных сообществ к самоочищению среды в естественных условиях ее загрязненности.

В связи с этим целью работы было изучить влияние различных факторов среды на синтез микробных гидролаз микроорганизмами, выделенными из бухты Золотой Рог г. Владивостока. Исследование было проведено поэтапно. На первом этапе изучали влияние температуры культивирования микроорганизмов на синтез микробных гидролаз (протеиназа, липаза), на втором изучали воздействие некоторых тяжелых металлов и сырой нефти на липазную активность микроорганизмов, на третьем исследовали влияние длительности хранения микробных

штаммов на синтез микробных гидролаз (липазы, протеиназы, амилазы).

1. Влияние температуры. Известно, что ферменты проявляют свою активность в определенном диапазоне температур. При этом для изолированных ферментов эта температура часто лежит в диапазоне выше + 30 °С [4]. Температура поверхностной воды в б. Золотой Рог летом обычно не поднимается выше + 22 °С, а зимой опускается до +1 – +2 °С [5]. По результатам наших исследований микроорганизмы, способные синтезировать в среду гидролитические ферменты выделяются из воды бухты в течение всего года. Для ответа на вопрос проявляется ли активность их экзогидролаз при низких температурах были проведены опыты, в которых использовали штаммы, выделенные из воды в разные сезоны года – в феврале, апреле, августе и октябре. Оценивали активность ферментов при температуре +22, +12 и + 4 °С. Результаты исследования показали, что только у 25 % штаммов при температуре +12 °С проявлялась слабая липазная активность, которая отличалась от соответствующей активности при + 22 °С в 2,5–3 раза (рис. 1). Такая особенность была характерна только для штаммов, выделенных из воды б. Золотой Рог в феврале и апреле. Казеиназная активность проявлялась у штаммов только при + 22 °С. Ни у одного из штаммов не было отмечено активности этого фермента при +12 °С, хотя микроорганизмы были способны к активному росту при этой и более низких (до +4 °С) температурах (рис. 1). Вероятно, микроорганизмы - гидролитики способны выживать при низких температурах, но активность и синтез гидролитических ферментов у них индуцируются только при достаточном прогреве воды.

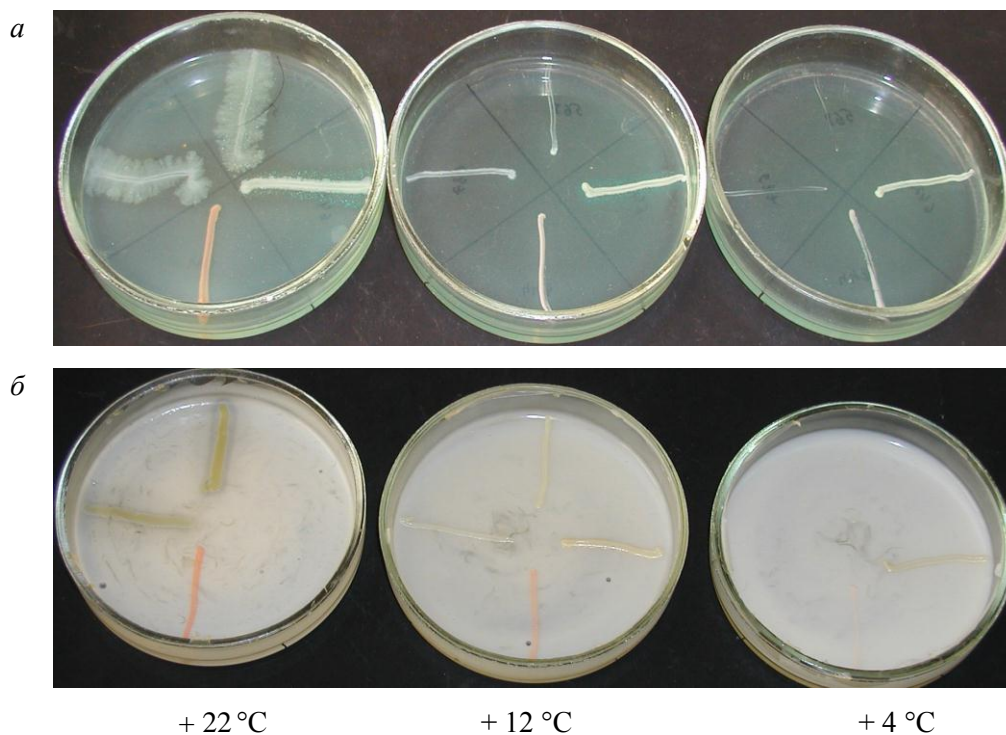


Рис. 1. Влияние температуры культивирования на гидролитическую активность бактерий, выделенных из поверхностных вод б. Золотой Рог
(а – липазная, б – протеиназная активность бактерий)

2. Влияние некоторых тяжелых металлов и сырой нефти. Из литературных источников известно, что многие токсиканты, такие, например, как ионы Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , а также нефтяные углеводороды могут отрицательно влиять на синтез ферментов, на их активность у микроорганизмов [4]. По данным Малышева А.А. с соавторами, Дулепова В.И. [6-7] известно, что в бухте Золотой Рог ежегодно отмечаются высокие концентрации нефтеуглеводородов, тяжелых металлов (Cu^{2+} и Cd^{2+}), которые превышают ПДК в несколько раз выше нормы. Кроме того, значительная часть водной поверхности бухты большую часть года покрыта нефтяными пятнами [2]. В связи с этим, важно было изучить, изменяется ли гидролитическая активность микроорганизмов под длительным воздействием нефтеуглеводородов и некоторых тяжелых металлов.

Результаты эксперимента показали, что ионы Cd^{2+} стимулировали проявление липазной активности у единичных штаммов. Воздействие на микроорганизмы ионов Cu^{2+} не способствовало синтезу фермента ни у одной из исследованных культур. Десятикратное пассирование выделенных штаммов в присутствии 1% сырой нефти, как единственного источника углерода, стимулировало проявление липазной активности у 1/3 всех микроорганизмов, что может указывать на индуцибельность гидролитических ферментов в присутствии соответствующего субстрата (рис. 2). Также это подтверждает, что количество микрофлоры, проявляющей определенную гидролитическую активность, может быть косвенным показателем уровня и характера загрязнения среды соответствующими загрязнителями.

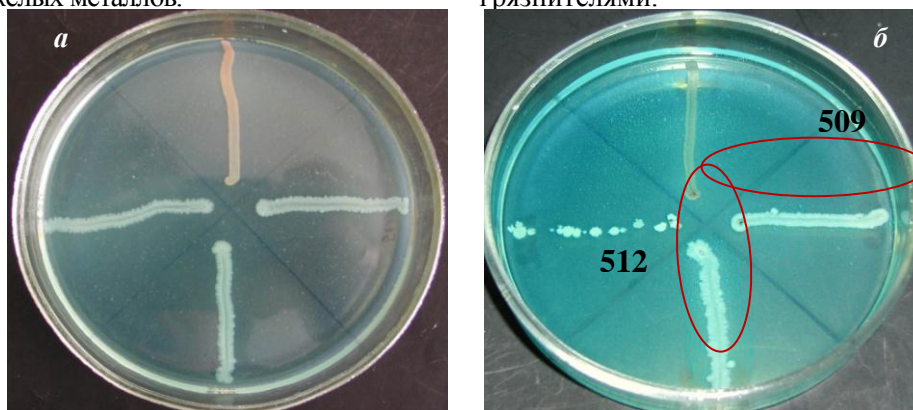


Рис. 2. Проявление липазой активности бактериальными штаммами, изолированными из вод бухты Золотой Рог (а - контроль (отсутствие активности), б - после 10 пассажей в присутствии 1% сырой нефти) (стимулируется у штаммов 509 и 512).

3. Влияние длительности хранения. Так как известно, что хранение микроорганизмов может изменять способность бактерий к синтезу гидролитических ферментов [8], были проведены исследования влияния времени хранения микробных штаммов на их ферментативную активность. Анализ способности штаммов синтезировать казеиназу, липазу и амилазу проводили сразу же после их выделения из морской воды и спустя 3 месяца хранения. Штаммы хра-

нили в столбике полужидкого агара под слоем вазелинового масла при температуре +4° С. Результаты исследования показали, что через 3 месяца хранения многие штаммы утратили свою гидролитическую активность или активность ее значительно снизилась. Изменение относительного количества коллекционных штаммов, способных к синтезу гидролитических ферментов после хранения показано на рис. 3.

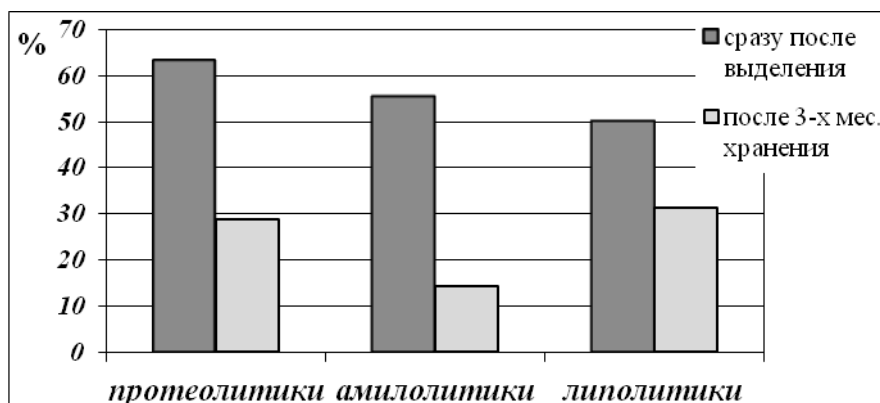


Рис. 3. Относительная численность коллекционных штаммов, выделенных из б. Золотой Рог и способных к синтезу различных экзогидролаз

Таким образом, установлено, что факторы среды могут влиять на синтез и активность микробных гидролитических ферментов. При пониженных температурах (+12° С) активность и синтез казеиназы у всех штаммов прекращался, липазная активность проявлялись только у зимних штаммов в значительно меньшей степени, чем при температуре + 24° С. Присутствие в среде сырой нефти стимулировало синтез и активность липазы. Гидролитическая активность штаммов значительно снижалась при их хранении. В результате исследований собрана коллекция штаммов, обладающих высокой гидролитической активностью и высокой устойчивостью к нефти. Данная коллекция в будущем может использоваться для ремедиации загрязненных морских акваторий.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Гаврилевский А.В., Гаврилова Т.А., Кочергин И.Е. Комплексная количественная оценка параметров источников загрязнения морской акватории, прилегающей к Владивостоку // Гидрометеорологические процессы на шельфе: оценка воздействия на морскую среду. - Владивосток: Дальнаука, 1998. - С.102 – 113.

2. Ващенко М.А. Загрязнение залива Петра Великого Японского моря и его биологические последствия // Биология моря. – 2000. - Т. 26, №3. - С. 149 – 159.

3. Калитина Е.Г., Безвербная И.П., Бузалева Л.С. Динамика численности гидролитически-активной микрофлоры в условиях комплексного загрязнения бухты Золотой Рог // Электронный журнал «Исследовано в России», 007, с. 56 – 66. 2006.

(<http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2006/007.pdf>)

4. Podgorska B. Mudryk Z. Distribution and enzymatic activity of heterotrophic bacteria decomposing selected macromolecular compounds in a Baltic sea sandy beach // Estuarine, Coastal and Shelf Science. - 2003. - Vol. 56, №3 – 4. - P. 539 – 546.

5. Звягинцев А.Ю., Корн О.М., Куликова В.А. Сезонная динамика пелагических личинок и оседание организмов – обрастателей в условиях термального загрязнения // Биология моря. - 2004. -Т. 30, №4. - С. 296 – 307.

6. Мальшев А.А., Иванова К.А., Фролова А.А. Экологическое состояние бухты Золотой Рог залива Петра Великого // Морская экология – 2002: Материалы международной научно-практической конференции. - Владивосток: МГУ, 2002. - 175 с.

7. Дулепов В.И. О систематическом мониторинге прибрежных вод г. Владивостока // Сборник научных трудов первой региональной научно-технической конференции «Приморские зори». - Владивосток, 1998. - 156 с.

8. Цыбань А.В., Теплинская Н.Г. О методе изучения морских липолитических бактерий // Гидробиология. - 1974. - Т. 10, №2. - С. 116 – 121.