

ХИТИНАЗЫ КАК ОДИН ИЗ ФАКТОРОВ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ
АКТИВНОСТИ БАЦИЛЛ-АНТАГОНИСТОВ

Г.Э. Актуганов, А.И. Мелентьев, Н.Ф. Галимзянова, Т.Ф. Бойко

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа, E-mail: gleakt@anrb.ru

CHITINASES AS ONE OF FACTORS DETERMINING ANTIFUNGAL
ACTIVITY OF ANTAGONISTIC BACILLI

G.E. Aktuganov, A.I. Melentiev, N.F. Galimzianova, T.F. Boyko

The Institute of Biology of Ufa Research Center RAS, Ufa, E-mail: gleakt@anrb.ru

ABSTRACT

The involvement of chitinases in antifungal effect of 12 different chitinolytic strains of *Bacillus subtilis* and *Paenibacillus* spp. was studied. The main source of antifungal activity that was indicated by studied strains in co-cultures with fungi is production of antibiotic compounds, whereas the chitinases were induced in trace quantities. The most of tested bacterial chitinases displays low fungal growth-inhibiting activity in vitro assays, however some of these enzymes were capable significantly enhance inhibiting effect and decrease minimal inhibiting concentration of antibiotic substances produced by same bacterial cultures.

Среди разнообразных сфер потенциального практического применения хитинолитических ферментов одним из ключевых направлений является разработка средств биологического контроля патогенных и сапротрофных грибов — возбудителей заболеваний человека, животных и растений, а также агентов биоповреждений [1, 2]. В связи с этим в настоящее время актуальной проблемой по-прежнему остается поиск и изучение новых эффективных антигрибных соединений биологического происхождения, включая вещества белковой природы, в том числе хитиназы [3]. Перспективным средством для решения данной проблемы является поиск и выделение активных соединений у микроорганизмов — естественных антагонистов и паразитов микромицетов. К числу наиболее широко исследуемых объектов в данной области относятся мицелиальные грибы родов *Trichoderma*, *Gliocladium* и представители прокариот — *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus* и некоторые другие.

Значительная рост-ингибирующая активность (10–20 мкг/мл) в отношении грибов была обнаружена у хитиназ *Trichoderma barzianum* [4] и *Serratia marcescens*. Вместе с тем у многих штаммов бацилл и других бактерий хитинолитические ферменты демонстрируют достаточно низкую антигрибную активность либо ее отсутствие. Некоторые исследователи предполагают, что биологическая активность хитиназ не связана напрямую с их каталитической функцией [3], поскольку большинство бактериальных и грибных хитиназ сходны по первичной структуре каталитического домена и на этом основании объединены в семейство 18 гликозил-гидролаз по классификации Henrissat [5].

Следует отметить, что у отдельных видов прокариот были обнаружены хитиназы, сходные по первичной структуре с растительными хитиназами (семейство 19 гликозил-гидролаз), проявляющими высокую антигрибную активность *in vitro*. Имеющиеся данные указывают на функциональное разнообразие хитинолитических ферментов у бактерий, однако неясной остается роль этих ферментов в механизмах антагонистического взаимодействия с микромицетами.

Фундаментальный аспект этой проблемы затрагивает не только количественное описание и оценку антигрибного эффекта непосредственно хитиназ *in vitro*, но и выяснение степени их участия в антагонизме и подавлении роста грибов при различных условиях специфического взаимодействия бактерий-антагонистов с различными видами микромицетов. Аэробные эндоспорообразующие бактерии продуцируют множество разнообразных по структуре соединений с антигрибной активностью и представляют собой гетерогенную в филогенетическом отношении группу, что позволяет рассматривать их как удобный и перспективный объект для сравнительного изучения антигрибной функции хитинолитических ферментов в таксономически (и экологически) удаленных группах бактерий-антагонистов.

В данной работе нами была изучена роль хитиназ в процессе антагонистического взаимодействия 12 различных хитинолитических штаммов бацилл с некоторыми видами фитопатогенных и сапротрофных почвенных грибов (*Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium culmorum*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium funiculosum*). Типовые представители исследуемой группы на основе анализа гена 16S рРНК были отнесены к виду *Bacillus subtilis*, а также к видам *Paenibacillus* spp. и *P. ebimensis*.

Исследуемые штаммы характеризовались избирательностью антагонистического действия в отношении тест-грибов, а также существенно отличались по способности к синтезу гидролитических ферментов, участвующих в деградации клеточных стенок грибов. В частности, представители рода *Paenibacillus* проявляли способность к конститутивной продукции β -1,3-1,4-глюканаз, тогда как штаммы *B. subtilis* не синтезировали эти ферменты даже в присутствии специфического индуктора.

Данная особенность отражалась на способности штаммов *B. subtilis* деградировать биомассу грибов и использовать ее в качестве ростового субстрата. Если штаммы обеих групп, *B. subtilis* и *Paenibacillus* spp., активно росли в присутствии крабового хитина и продуцировали хитинолитические ферменты, то при использовании в качестве источника хитина мицелия гриба *Bipolaris sorokiniana* значительный рост и синтез хитиназ наблюдался только у представителей *Paenibacillus* spp.

Полученные результаты коррелировали с проявлением миколитической активности в исследуемой группе штаммов, показывая, что способность к синтезу внеклеточных хитиназ не может служить единственным критерием и индикатором миколитических свойств бактерий-антагонистов. Штаммы групп *Paenibacillus* spp. и *B. subtilis* значительно отличались и по составу хитинолитического комплекса ферментов: если штаммы первой группы преимущественно продуцировали экзохитиназы (хитобиогидролазу), а также хитозаназы, то представители вида *B. subtilis* — исключительно хитиназы с эндомеханизмом действия.

При имитации взаимодействия бацилл-антагонистов с грибами в среде, богатой легкоусвояемыми источниками углерода (глюкоза, сахароза), зависимость антагонистического эффекта бактерий от синтеза хитиназ и других литических ферментов практически не выявлялась. В этих условиях степень подавления роста грибов определялась у большинства штаммов такими факторами, как скорость роста и уровень продукции антибиотических веществ. Существенное значение имела также устойчивость бацилл к антибактериальным метаболитам, образуемым некоторыми микромицетами.

В условиях ограничения источников органического углерода и азота в питательной среде у штаммов *Paenibacillus* spp., в отличие от *B. subtilis*, при взаимодействии с *Bipolaris sorokiniana* наблюдался синтез гликозил-гидролаз, участвующих в деградации клеточной стенки этого гриба. При этом наибольшую роль в миколитическом действии штамма *P. ebimensis* ИБ-739 играли β -1,3-глюканазы и протеазы, тогда как синтез хитиназ не индуцировался на протяжении длительного времени взаимодействия (не

менее 7 сут). Другие штаммы *Paenibacillus* spp. показывали хитиназную активность на следовом уровне (табл.), что может указывать на косвенное участие хитинолитических ферментов бацилл в их антагонистическом воздействии на грибы при определенных условиях. Следует отметить, что хитиназы всех исследуемых штаммов являлись индуцибельными ферментами, при этом у представителей рода *Paenibacillus* их биосинтез индуцировался на заметном уровне в присутствии 0,1–0,25% (с/в) мертвого мицелия различных видов микромицетов.

Продукция хитинолитических ферментов некоторыми штаммами бацилл-антагонистов в смешанной культуре с грибом *Biplaris sorokiniana* и фунгистатическая активность очищенных хитиназ, продуцируемых этими штаммами в среде с 0,5 масс. % коллоидного хитина из панцирей краба

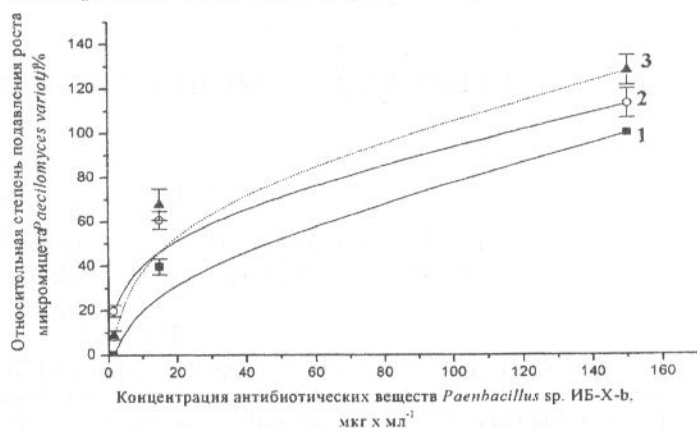
Номер штамма	Синтез хитиназ в смешанной культуре с <i>B. sorokiniana</i> *, мкМ·мл ⁻¹ ·мин ⁻¹	Диаметр зоны ингибирования роста <i>B. sorokiniana</i> препаратами очищенных хитиназ (1 мг/мл) на 3 сут культивирования на КГА**
<i>B. subtilis</i> ИБ-21	0,06±0,01	11±1
<i>B. subtilis</i> ИБ-24-2	Не обнаружено	Нет активности
<i>B. subtilis</i> ИБ-33-1	Не обнаружено	21±2
<i>B. subtilis</i> ИБ-34-а	Не обнаружено	17±2
<i>Paenibacillus</i> sp. ИБ-Х-в	0,13±0,02	Нет активности
<i>P. ebimensis</i> ИБ-739	Не обнаружено	Нет активности
<i>Paenibacillus</i> sp. ИБ-Г2-р	0,12±0,02	Нет активности
<i>Paenibacillus</i> sp. ИБ-522	0,05±0,01	Нет активности

*Активность измеряли по скорости образования *p*-нитрофенола при гидролизе *p*-НФ-N,N'-диацетил-β-D-хитобиозы (5 мМ, 20 мин при рН 6,0 и 50 °С); смешанное культивирование проводили в стандартной 2-кратно разбавленной картофельной среде;

**Объем вносимого препарата не превышал 100 мкл.

Фактором, лимитирующим проявление хитинолитической активности бацилл при взаимодействии с живыми грибами в условиях роста, являлось прежде всего низкое содержание вносимой в среду биомассы грибов (менее 0,01% по с/в). В отличие от хитиназ биосинтез β-1,3-глюканаз у штаммов *Paenibacillus* spp., как упоминалось выше, был конститутивным, и базовый уровень секреции этих ферментов был примерно одинаков (1,5–2,5 ед/мл) на питательных средах с различными источниками углерода, за исключением глюкозы при ее концентрациях от 0,4% и выше. Прямая оценка фунгистатической/фунгицидной активности препаратов очищенных хитиназ показала неоднозначные результаты, однако ферменты большинства штаммов бацилл-антагонистов при концентрации 1 мг/мл не ингибировали рост *B. sorokiniana* (см. табл.).

Тем не менее дальнейшие эксперименты на отдельных штаммах показали, по меньшей мере, косвенное участие хитиназ в антагонистическом действии бацилл. В частности, при изучении влияния очищенных ферментов *Paenibacillus* sp. ИБ-Х-в на активность изолированной фракции антибиотических соединений, образуемых тем же штаммом, было обнаружено, что при внесении в препарат хитиназа усиливает степень подавления тест-гриба на 13–50% и снижает минимальную ингибирующую концентрацию липопептидных антибиотиков до 1,5 мкг/мл (рис.). Наиболь-



Концентрационные кривые ингибирования роста гриба *Paecilomyces variotii* изолированной фракцией антибиотических соединений штамма *Paenibacillus* sp. ИБ-х-в без добавления ферментов (1), с добавлением очищенной хитиназы (2) и смеси литических ферментов (3) того же штамма.

Активность хитиназы в препаратах — не менее 0,10 ед/мл

ший синергический эффект проявлялся при средних и низких концентрациях антибиотика, тогда как сам фермент во вносимых количествах ингибирующей активностью не обладал.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что хитинолитическая активность бацилл-антагонистов не может служить достоверным критерием их эффективности в подавлении роста грибов, поскольку хитиназы многих штаммов аэробных спорообразующих бактерий проявляют низкую антигрибную активность *in vitro*. Тем не менее для отдельных штаммов очевидна непрямая роль хитиназ как эффекторов, усиливающих общую противогрибковую активность других метаболитов.

Для дальнейшего изучения этого вопроса и оценки перспектив применения хитинолитических ферментов различных штаммов бацилл в биологическом контроле патогенных грибов необходимо более детальное и скорректированное исследование биологической активности хитиназ большого числа видов, а также выявление специфических особенностей их антагонистического действия на различные виды микроорганизмов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 07-04-00812-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Patil R.S., Ghormade V., Deshpande M.V. Chitinolytic enzymes: an exploration // Enzyme Microb. Technol. 2000. V. 26. P. 473–483.
2. Gobel V., Singh A., Vimal M. et al. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms // Afr. J. Biotechnol. 2006. V. 5. P. 54–72.
3. Theis T., Stahl U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications // CMLS. 2004. V. 61. P. 437–455.
4. Lorito M., Harman G.E., Hayes C.K. et al. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma barzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase // Phytopathol. 1993. V. 83. P. 302–307.
5. Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities // Biochem. J. 1991. V. 280. P. 309–316.