

УДК 664.959:595.3(268.45)

**Эколого-биохимические аспекты биотрансформации
хитина в Баренцевом море***Н.В. Шумская, О.Р. Узбекова, В.Ю. Новиков, В.А. Мухин*

Полярный научно-исследовательский институт морского рыбного хозяйства и океанографии им.
Н.М. Книповича (ФГБНУ «ПИНРО»), г. Мурманск
E-mail: nowit@pinro.ru

В последние десятилетия в бентосных сообществах Баренцева моря существенно увеличился и изменился состав хитинсодержащих организмов, главным образом, за счёт вселения крупных ракообразных — камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* и краба-стригуна опилио *Chionoecetes opilio*. Для бентали всего Баренцева моря это означает увеличение биомассы хитина примерно в 2 раза. В районах, в которых образуются промысловые скопления камчатского краба и ведётся его активный промысел и переработка, биомасса хитина увеличивается в десятки раз. Экосистема Баренцева моря способна медленно утилизировать хитин, однако имеется опасность накопления значительных объёмов этого вещества на грунте, что может повлечь за собой кардинальные изменения в бентосных сообществах и далее во всех биотопах. При интенсивном ответе системы (резком увеличении биомассы хитиноредуцирующих бактерий) возможны негативные последствия в виде всплесков бактериальных заболеваний ракообразных, что также влечёт за собой существенные экологические изменения. На основе модельных экспериментов было рассчитано, что сброшенный в Баренцево море панцирь ракообразных утилизируется примерно в течение 20–25 сут, а на утилизацию чистого хитина уходит около 200 сут, при условии сохранения видового и численного составов микроорганизмов грунта. Определено, что основную роль в биотрансформации хитина играют микроорганизмы *Rhodococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. и *Acinetobacter* sp. Культуры этих организмов были идентифицированы в грунтах из различных участков Баренцева моря. Из культуральной жидкости изученных бактерий выделены ферментные комплексы, обладающие эндохитиназой и экзохитиназой активностями. Средняя молекулярная масса фракции белков, обладающих хитинолитической активностью, составляет 90–135 кДа.

Ключевые слова: хитиноредуцирующие бактерии, экзо- и эндохитиназы, крабы-вселенцы, баланс хитина в Баренцевом море.

ВВЕДЕНИЕ

В круговороте основных биогенных элементов в природе — углерода и азота — значимую роль играет хитин, благодаря своей широкой распространённости в живых организмах. Хитин является химически инертным соединением, нерастворимым в воде, что может обуславливать его длительное сохране-

ние в природной среде. Несмотря на это, хитин в большинстве случаев не накапливается в природных экосистемах, а подвергается разрушению. По-видимому, основным путём деградации хитина является его биodeградация под действием микроорганизмов, продуцирующих хитинолитические ферменты [Yu et al., 1991; Keyhani, Roseman, 1999]. При расще-

плении хитина высвобождаются легкоусваиваемые соединения азота и углерода, которые вновь включаются в круговорот веществ [Kang et al., 2005].

Вероятно, в природе существует некоторое равновесие между численностью ракообразных и хитинрасщепляющих бактерий. Рост последних не только ускоряет биологическую утилизацию хитина, но и способствует снижению роста популяции ракообразных за счёт уменьшения их выживаемости при заболеваниях панциря [Рязанова, 2005; 2006; Стексова, 2003].

В экосистемах холодных северных морей хитин, синтезируемый многочисленными ракообразными и другими гидробионтами, утилизируется медленнее, чем в более тёплых районах Мирового океана [Байтаз, 1990]. Следовательно, существует опасность накопления значительных объёмов этого вещества на морском грунте.

Актуальность исследования хитина применительно к Баренцеву морю объясняется тем фактом, что, по нашему мнению, за последние десятилетия в этой акватории существенно изменился баланс хитина. Это произошло, главным образом, вследствие вселения новых хитиносодержащих организмов: камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* (Tilesius, 1815) и краба-стригуна опилио *Chionoecetes opilio* (Fabricius, 1788). В результате возможны образования крупных скоплений хитина на морском дне, которые обусловлены хозяйственной деятельностью человека, связанной с промышленным ловом ракообразных. Переработка крабов ведётся непосредственно на судах, а отходы от разделки сбрасываются в море. Существенные объёмы переработки ракообразных в Баренцевом море (десятки тысяч тонн) [Состояние..., 2015] определяют мощный антропогенный фактор, который способен сдвинуть равновесное состояние экосистемы и привести к накоплению хитина в морских осадках, а, следовательно, к элиминации из активного обмена больших масс азота и углерода.

Проблема усугубляется тем, что промысел и переработка крабов, а, следовательно, сброс отходов от разделки (до 50% от массы животного) ведутся на весьма ограниченном ареале. Интенсивность его вылова составляет порядка

4 т/км². Следовательно масштабы «экологического пресса» могут быть достаточно высоки.

Внесение в Баренцево море значительного количества хитина может привести к нарушению сложившегося природного баланса этого вещества и спровоцировать изменения в бентосных сообществах и далее во всех биотопах Баренцева моря.

Учитывая низкую температуру северных морей и малое по сравнению с южными морями содержание хитиновых (как и других) бактерий, возможно накопление хитина на дне.

Последствия акклиматизации крупных крабов в Баренцевом море достаточно широко обсуждались в научной литературе, но оценка осуществлялась, как правило, с «макроэкологической» точки зрения. Подробно изучалось влияние вселенцев на состояние популяций различных промысловых объектов, главным образом, тресковых рыб, и, преимущественно, с точки зрения трофологии [Галкин, 1962]. Мы попытались взглянуть на эту проблему с «микроэкологической», т. е. с эколого-биохимической точки зрения.

Таким образом, изучение деструкции хитина актуально как с научной, так и практической стороны. Во-первых, это позволяет оценить устойчивость экологического равновесия и вероятность отрицательного воздействия на экосистему Баренцева моря из-за внесения больших объёмов хитина, в частности, панцирей крабов, как отходов промысла и переработки. Во-вторых, изучение хитинолитических ферментов открывает возможность их применения в различных отраслях народного хозяйства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе изучались микроорганизмы, выделенные из грунта литоральной зоны бухты Белокаменная Кольского залива (участок 1, грунт илистый), губы Териберская Баренцева моря (участок 2, грунт песчаный), а также открытых участков Баренцева моря (участок 3, грунт песчаный), собранных в научно-исследовательских рейсах в 2013–2015 гг. (рис. 1).

Пробы грунта отбирали с соблюдением правил асептики [Руководство ..., 2003; Ла-

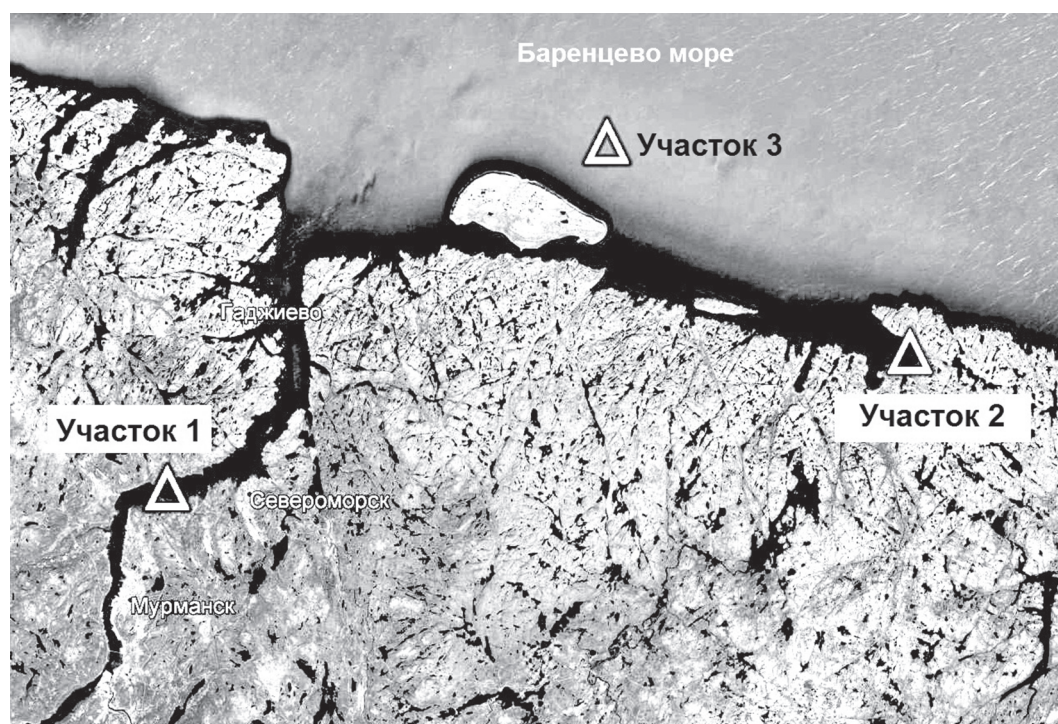


Рис. 1. Карта-схема с участками отбора проб

бинска, 1978] на участках 1 и 2 с глубины не более 1 м, а на участке 3 — с глубины около 150 м.

Десорбцию микроорганизмов с грунта осуществляли ультразвуком в течение 15 с при помощи ультразвуковой ванны Elmasonic S30N («Elma», Германия) с частотой 37 кГц.

Для выделения и учёта эвтрофных и олиготрофных микроорганизмов использовали СПА и ММС, соответственно. Количество хитин разлагающих микроорганизмов данных трофических групп определяли на тех же средах, но с добавлением хитина. Процентное содержание хитинолитических микроорганизмов вычисляли как отношение их количества к общему количеству выделенных микроорганизмов.

Для культивирования микроорганизмов использовали модифицированную питательную среду ММС (NaCl — 7,0 г; $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 1,0 г; KCl — 0,7 г; K_2HPO_4 — 2,0 г; Na_2HPO_4 — 3,0 г; NH_4NO_3 — 1,0 г; вода дистиллированная — 1000 мл) с добавлением 2% агар-агара и 1% коллоидного хитина.

Для выделения чистой бактериальной культуры с первичных посевов отбирали колонии,

образующие зону лизиса. Отобранные колонии пересеивали на твёрдую хитинсодержащую среду для дальнейшего анализа.

Культивирование микроорганизмов осуществляли в анаэробных условиях при температуре 5 °С.

Идентификацию микроорганизмов проводили по определителю бактерий Берджи [Определитель..., 1997].

Хитиноредуцирующую активность микроорганизмов определяли по отношению площади зоны лизиса к площади колонии [Логинов и др., 2006].

С целью обнаружения и очистки бактериальных хитиназ колонии с зоной лизиса были перенесены с чашек Петри во флаконы, содержащие ту же питательную среду, но без добавления агара. Бактериальные клетки отделяли на центрифуге Avanti J-25 («Beckman Instrument», США) с фактором осаждения 16000 g в течение 20 мин при 4 °С. Для осаждения ферментов к надосадочной жидкости добавляли сульфат аммония до 60% насыщения раствора. Осадок отделяли центрифугированием и диализовали на мембранах против дистиллированной воды.

Коллоидный хитин готовили переосаждением из раствора в холодной концентрированной HCl по методике [Decleire et al., 1996].

Скорость расщепления хитина микроорганизмами в лабораторных и природных условиях определяли гравиметрическим методом. В лаборатории инкубацию хитина и панциря ракообразных с микроорганизмами, выделенными из грунта литоральной зоны Баренцева моря, проводили во флаконах, установленных в термостате Модель 1024 («Tekator», Швеция) с постоянным перемешиванием при температурах 6–8 °С, соответствующих природным условиям, и комнатной (20–22 °С), моделирующей ускоренный гидролиз хитина. В природных условиях образцы хитина и панциря помещали в мешки из капроновой сетки и закрепляли металлическими скобами на поверхности грунта на глубине около 1 м. После инкубирования частицы хитина промывали 2% соляной кислотой, 12% гидроксидом натрия, этанолом и высушивали при 105 °С в течение 6 час. Количество разложившегося хитина было определено по разнице начальной массы хитина и его массы после инкубирования [Hood, Meyers, 1977].

Для определения массовой доли хитина образцы грунта обрабатывали 12 моль/л HCl в течение 1 ч при 90 °С для полной кислотной деполимеризации хитина и образования D(+)-глюкозамина. Концентрацию D(+)-глюкозамина в гидролизате определяли методом ВЭЖХ на обращённой фазе по методике [Studelska et al., 2006], с использованием хроматографа LC-10A («Shimadzu Corp.», Япония), колонки Supelcosil LC-18 (250 × 4 мм, 5 мкм) («SUPELCO», США), скорость элюирования — 0,8 мл/мин. Массовую долю хитина рассчитывали по количеству образовавшегося D(+)-глюкозамина.

Концентрацию белка в культуральной жидкости определяли по методу Лоури [Практическая химия..., 1989].

Молекулярно-массовое распределение белков в образцах определяли методом гель-хроматографии низкого давления с использованием аппаратуры «Pharmacia LKB Biotechnology» (Швеция) и стандартов белков MWGF200 («Sigma-Aldrich», США), а также методом ДДС-ПААГ электрофо-

реза с использованием системы планарного электрофореза Multiphor II («Pharmacia LKB Biotechnology», Швеция) с применением в качестве стандартов набора низкомолекулярных белков («Amersham. GE Healthcare», Великобритания).

Эндохитиназную активность измеряли в процентах уменьшения оптической плотности раствора коллоидного хитина до и после инкубации с культуральной жидкостью [Decleire et al., 1996].

Экзохитиназную активность определяли по образованию окрашенного продукта N-ацетилглюкозамина (АцГЛА) с 4-диметиламинобензальдегидом [Decleire et al., 1996; Reissig et al., 1955].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Баланс хитина в Баренцевом море. Среди морских бактерий для крабов представляют реальную опасность те из них, которые обладают хитинолитическими свойствами, — *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Photobacterium* sp. и другие. Эти бактерии способны лизировать хитин внешних покровов ракообразных, вызывая тяжёлое заболевание у животных. Хитинолитическая бактериальная болезнь панциря крабов приводит к поражению панцирных покровов ракообразных. Это наиболее широко распространённое бактериальное заболевание ракообразных [Рязанова, 2005; 2006]. Патологические изменения органов у ракообразных с сильной степенью поражения панцирной болезнью, очевидно, ведут к гибели животных [Стексова, 2003].

Мы попытались оценить «масштаб бедствия», т. е. объем дополнительного хитина, поступающего в систему Баренцева моря в связи с вселением крабов.

По оценке, произведённой специалистами ПИНРО, биомасса *P. camtschaticus* составляет 250–260 тыс. т, *S. opilio* — около 300 тыс. т [Баканев, Павлов, 2010]. При этом следует учитывать, что камчатский краб сосредоточен главным образом в южной части Баренцева моря на площади порядка 120 тыс. км², а краб-стригун опилио расселён более равномерно на всей акватории Баренцева моря, на площади порядка 400 тыс. миль². Рассчитав суммарную биомассу крабов

на площадь расселения, мы получаем значение порядка 2,4 т крабов-вселенцев на 1 км² акватории южной части Баренцева моря.

Была проведена оценка биомассы хитинсодержащих организмов, традиционно населяющих Баренцево море (общая площадь 1,424 млн. км²). Известно, что биомасса зоопланктона в Баренцевом море, включая микро-, мезо- и макрозоопланктон permanently составляет порядка 110 млн. т [Дробышева, 1994; Жизнь и условия..., 1985].

Вероятно, сюда следует добавить 4 млн. т креветки *Pandalus borealis* и незначительное количество крабов-аборигенов родов *Hyas* и *Lythodes*, составляющих бентосное сообщество. Дальнейший расчёт показывает, что среднегодовая биомасса всех хитинсодержащих организмов в Баренцевом море составляет около 81,7 т/км², т. е. биомасса вселенцев не превышает даже 3%. Даже учитывая тот факт, что содержание хитина в крупных ракообразных (табл. 1) превосходит таковое в зоопланктоне, данной величиной можно было бы пренебречь.

С другой стороны, крабы-вселенцы являются членами бентосного сообщества. Бентосные сообщества более замкнуты и консервативны по видовому и численному составу организмов. Расчёт биомассы хитинсодержащих организмов показал, что на долю вселенцев в бентали приходится около 50%.

Кроме того, по данным ПИНРО в районах промысловых скоплений доля крупных промысловых крабов многократно возрастает (рис. 2).

Средняя биомасса хитинсодержащих таксонов с учётом камчатского краба и в пересчёте на живой вес в целом по району оценена в $8,52 \pm 1,43$ г/м². Из десятиногих раков

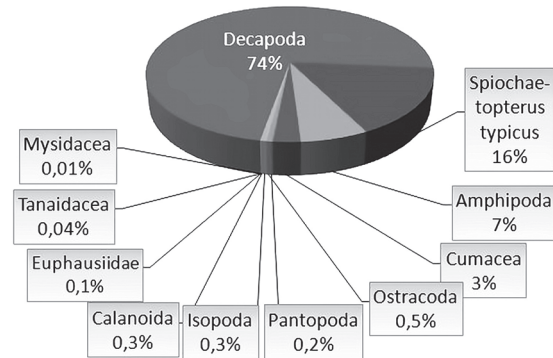


Рис. 2. Соотношение биомассы хитинсодержащих таксонов в районе промысловых скоплений камчатского краба (в районе Канинской банки, Мурманского мелководья и Восточного Прибрежного района) по данным ПИНРО

(Decapoda), доминирующих среди хитинсодержащих организмов по биомассе, более 90% приходится на камчатского краба, и лишь несколько процентов приходится на остальные виды [Anisimova et al., 2011].

Таким образом, ежегодно образуется несколько тонн хитина. Принимая во внимание, что хитин является полисахаридом, устойчивым к действию факторов окружающей среды, с трудом поддающемуся химическому расщеплению, поэтому практически не усваивается большинством живых организмов. Следовательно, есть опасность накопления значительных объёмов его на дне моря. В действительности количество хитина в донных осадках относительно невелико.

В наших экспериментах мы определили, что концентрация хитина в грунте бухты Белокаменная Кольского залива составила 7,5–8,1 мкг/г, в грунте губы Терiberская — 1,94 мкг/г. В грунте открытой части Баренцева моря было обнаружено также очень низкое содержание хитина — от следов до 1,0 мкг/г.

Таблица 1. Химический состав сырья (массовая доля, %)

Наименование компонента	Краб-стригун опилио	Северный криль	Северная креветка	Камчатский краб
Вода	82,15	73,49	76,2	78,4
Белок	14,65	14,13	15,94	11,60
Хитин	1,05	0,70	1,12	1,60
Минеральные вещества	1,65	1,98	3,40	3,70
Липиды	0,50	9,70	3,34	2,80

В тоже время установлено, что концентрация хитина в толще морской воды ещё ниже (0,13–0,24 мкг/г).

Очевидно, высокая концентрация хитина в пробах грунта, отобранных в литоральной зоне, может быть связана не только с хитин-содержащими организмами населяющими данные районы, но может так же иметь и терригенную природу.

Определение скорости расщепления хитина в морских условиях. Для оценки скорости биотрансформации хитина нами были проведены эксперименты по расщеплению хитина под действием хитинолитических микроорганизмов в лабораторных (*in vitro*) и естественных (*in vivo*) условиях.

Гравиметрическим методом *in vitro* показано уменьшение массы хитина под действием микроорганизмов, обитающих в грунте Баренцева моря. Эксперименты *in vitro* проводились при повышенной температуре для ускорения гидролиза хитина в лабораторных условиях. Масса хитина снижалась на 13–70% (в среднем около 45%) за 45 сут инкубации при комнатной температуре (22 °C), что соответствует примерно 1%/сут. Колебания обусловлены, по-видимому, особенностями микрофлоры той или иной литеральной зоны

На литорали Баренцева моря в районе пос. Териберка (участок 2) была предпринята попытка определить скорость разложения хитина *in vivo*. Для этого образцы чистого хитина и панциря краба были погружены в воду и закреплены на грунте.

Установлено, что скорость расщепления чистого хитина составила от 0,32 до 0,59%/сут. Скорость расщепления панцирей крабов значительно выше — в среднем 4,7%/сут. Это объясняется тем, что, помимо хитина, карапакс ракообразных состоит из различных органических веществ, в т. ч. белков, которые значительно легче гидролизуются.

Таким образом, экспериментально установлено, что скорость расщепления хитина, как в лабораторных, так и в естественных условиях не превышает 1%. Так же отметим, что в лабораторном эксперименте для деструкции хитина использовались микроорганизмы, значит, в естественных условиях биотрансформация хити-

на в основном осуществляется микроорганизмами. Следовательно, бактериобентос, являясь одним из компонентов экосистемы, принимает активное участие в деструкции хитина

С учётом вышеприведённых цифр и на основании расчётов мы предположили, что сброшенный в Баренцевом море панцирь ракообразных утилизируется примерно в течение 20–25 сут, а на утилизацию чистого хитина уйдёт около 200 сут, при условии сохранения видового и численного состава микроорганизмов. Однако следует учесть, что избыток субстрата будет провоцировать рост количества хитиноредуцирующих бактерий, что может заметно уменьшить срок полного расщепления хитина.

Каждый вид микроорганизмов имеет определённый набор ферментов, однако под воздействием различных факторов спектр синтезируемых ферментов может изменяться. Отмечено, что образование микроорганизмами хитинолитических ферментов происходит при наличии в среде хитина [Шубаков, Кучерявых, 2004].

Обнаружение хитиноредуцирующих бактерий. Микроорганизмам принадлежит важная роль, они участвуют в круговороте органического вещества, обуславливая тем самым уровень первичной продукции, а также в процессах самоочищения. Все эти функции осуществляются главным образом гетеротрофной частью микробного сообщества, которое структурно представлено различными трофическими группами микроорганизмов.

Предварительные исследования по обнаружению микроорганизмов с хитинолитической активностью в донных осадках Мурманского берега и литорали Кольского залива показали наличие хитинолитической активности как среди олиготрофных, так и эвтрофных микроорганизмов. На рис. 3 показано, как при инкубации проб грунта из участка 1 (литораль Кольского залива) по мере роста колоний увеличивается зона гидролизованного хитина, представленная темными ареолами прозрачного раствора продуктов расщепления хитина на фоне агара, содержащего непрозрачную суспензию нерастворённого хитина.

В пробах грунта, отобранного на литорали Кольского залива (участок 1), хитинолитиче-

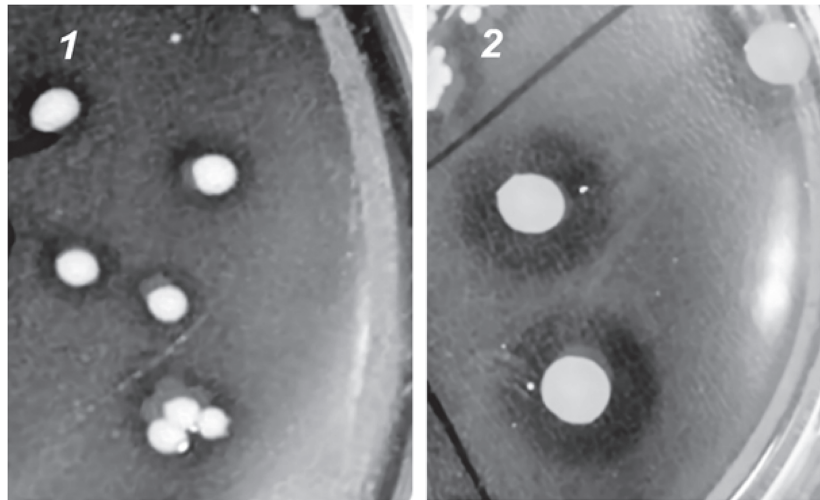


Рис. 3. Зоны гидролизованного хитина (темные ореолы) вокруг колоний микроорганизмов, выделенных из пробы грунта (участок 1) на сухом питательном агаре.
1 — 7-е сутки после начала культивирования; 2 — 14-е сутки

ские бактерии составляли в среднем 2,2% от общего количества гетеротрофного бактериобентоса. В то время как в исследуемых пробах грунта со 2 участка численность хитинолитических бактерий на порядок меньше, что может быть обусловлено гранулометрическим составом донных осадков. Так, известно, что в илистых грунтах численность бактерий больше, чем в песчаных [Зенкевич, 1956].

В пробах морского грунта, отобранного в открытой части моря (участок 3), микроорганизмы, способные расщеплять хитин, не обнаружены.

Отсутствие хитиноредуцирующих бактерий и очень низкая концентрация хитина в образцах грунта Баренцева моря может быть объяснено несколькими причинами.

Анализ распределения хитиноредуцирующих бактерий позволяет предполагать, что в основном они концентрируются в местах скопления ракообразных или их останков. После расщепления хитинобелкового субстрата рост бактерий снижается, а затем они погибают. В результате мы наблюдаем отсутствие как субстрата, так и утилизирующих его бактерий. В исследовании М. Пулисек и С. Жено [Poulisek, Jeuniaux, 1989] был проведён скрининг образцов грунта из различных акваторий Мирового океана, который показал повсеместно низкое содержание хитина. Авторы объясняют этот факт активным разложением

хитина, при котором соблюдается баланс его синтеза и распада.

Можно предположить, что основным источником хитиноредуцирующих бактерий являются сами хитиносодержащие организмы. Большое количество хитиновых тканей, образующихся после их линьки или гибели, по-видимому, индуцирует взрывной рост бактерий. Известно, что в местах интенсивного промысла крабов отмечается рост заболеваний ракообразных панцирной болезнью [Benhalima et al., 1998; Рязанова, 2006]. По мере истощения субстрата (хитина), численность хитиноредуцирующих бактерий снова снижается. Таким образом, соблюдается баланс хитина в природе.

Численность хитиноредуцирующих бактерий в пробах грунта литоральной зоны по сравнению с пробами грунта Баренцева моря выше, возможно за счет аллохтонных микроорганизмов. Ранее было отмечено, что концентрация хитина больше в пробах грунта с литоральной зоны, чем с Баренцева моря. В свою очередь численность микроорганизмов так же может зависеть и от концентрации хитина в грунте.

Идентификация хитиноредуцирующих микроорганизмов. Из природных субстратов участков 1 и 2 выделили 4 культуры микроорганизмов (*Rhodococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp.), обладаю-

щих способностью к активному росту на питательных средах, содержащих хитин.

После 60 сут культивирования выделенных микроорганизмов в питательной среде, содержащей 1% хитина, визуально наблюдается уменьшение его содержания — суспензия коллоидного хитина белого цвета (контрольный образец 1) постепенно становится прозрачной (рис. 4). Во флаконе с культурой *Rhodococcus* sp. в растворе коллоидный хитин полностью отсутствует.

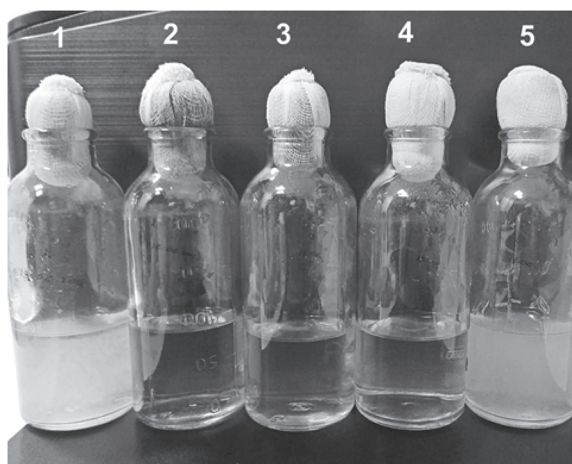


Рис. 4. Питательная среда, содержащая 1% коллоидного хитина с культурами исследуемых микроорганизмов (экспозиция 60 сут).

1 — культура без микроорганизмов; 2 — *Rhodococcus* sp.; 3 — *Bacillus* sp.; 4 — *Pseudomonas* sp.; 5 — *Acinetobacter* sp.

Для микроорганизмов родов *Rhodococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. отмечено большее снижение концентрации хитина по сравнению с микроорганизмами рода *Acinetobacter* sp. Секретируемый фермент по мере накопления в среде гидролизует коллоидный хитин. По-видимому, образующиеся

в ходе этого процесса хитоолигомеры усиливают индуцибельный эффект субстрата, что приводит к увеличению активности хитинолитических ферментов. Полученные данные визуального наблюдения свидетельствуют о различной природе активности хитиназ выделенных культур (рис. 4). Оценка хитиноредуцирующей активности выделенных культур показала, что культура *Rhodococcus* sp. обладает в два раза большей активностью по сравнению с *Bacillus* sp. и *Pseudomonas* sp. и в четыре раза большей по сравнению с *Acinetobacter* sp. (табл. 2).

Характеристика хитинолитических ферментов. По нашим данным, эндохитиназная активность фермента культуры микроорганизмов рода *Rhodococcus* sp. выше по сравнению с таковой культур микроорганизмов родов *Bacillus* sp. и *Acinetobacter* sp. (рис. 6). Эндохитиназную активность ферментов в культуральной жидкости культуры микроорганизмов рода *Pseudomonas* sp. определить не удалось.

Экзохитиназная активность ферментов культур микроорганизмов родов *Bacillus* sp. и *Pseudomonas* sp. выше в 2,5 раза, чем ферментов культур микроорганизмов родов *Rhodococcus* sp. и *Acinetobacter* sp. (рис. 6).

Можно предположить, что активность хитиноредуцирующего комплекса может быть обусловлена формой бактериальных клеток. По данным В.А. Байтаза и коллег [Байтаз и др., 1996], для кокков свойственна более высокая интенсивность биохимических процессов по сравнению с палочковидными формами бактерий в связи с большей (в среднем в 1,5 раза) удельной поверхностью клетки, что позволяет полнее использовать ресурсы среды. По результатам микроскопии определено, что

Таблица 2. Хитиноредуцирующая активность микроорганизмов разных культур

№ п/п	Культура	Форма бактерии	Окраска по Граму	Площадь, мм ²		Хитиноредуцирующая активность, мм ² /мм ²
				Зона лизиса	Колония	
1	<i>Rhodococcus</i> sp.	палочки	+	505	121	4,2
2	<i>Bacillus</i> sp.		+	1208	542	2,2
3	<i>Pseudomonas</i> sp.		—	1729	910	1,9
4	<i>Acinetobacter</i> sp.		—	144	138	1,04

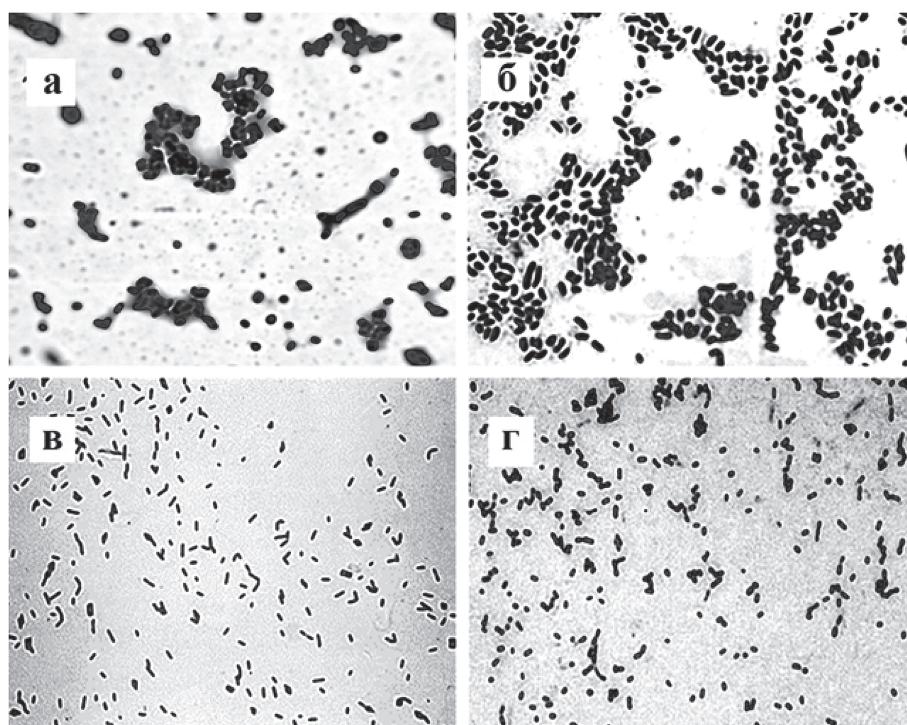


Рис. 5. Морфология клеток бактерий родов *Rhodococcus* sp. (а), *Bacillus* sp. (б), *Pseudomonas* sp. (в) и *Acinetobacter* sp. (г)

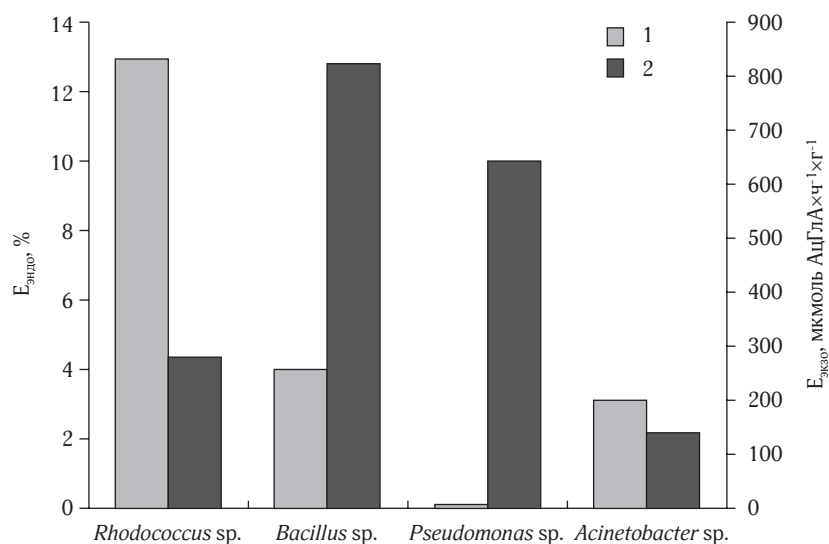


Рис. 6. Эндо- и экзохитиназная активность ферментов культуральной жидкости.

1 — эндохитиназная активность, %; 2 — экзохитиназная активность, мкмоль АцГЛА×ч⁻¹×г⁻¹

выделенные культуры микроорганизмов представлены палочками. Однако микроорганизмы рода *Rhodococcus* (культура 1) в начальном этапе морфогенетического цикла имеют форму кокков.

Следует отметить, что скорость гидролиза экзохитиназами будет зависеть от активности эндохитиназ, т. е. от скорости образования концевых участков молекул хитина. При начальном взаимодействии эндохитиназ с субстратом

образуются растворимые полисахариды, которые, в свою очередь, играют роль индукторов экзохитиназ [Логинов и др., 2006].

Вероятно, микроорганизмы родов *Bacillus* sp. и *Rhodococcus* sp. участвуют в начальных этапах биодеструкции хитина панциря ракообразных, а бактерии родов *Pseudomonas* sp. и *Acinetobacter* sp. включаются в последующие этапы разрушения хитина. Таким образом, исследуемые микроорганизмы секретируют ферменты с различной субстратной специфичностью.

При анализе состава белков культуральной жидкости выделенных культур методом гель-хроматографии и электрофореза обнаружено две фракции с диапазоном молекулярной массы (ММ) от 92,5 до 134,5 кДа (фракция 1) и от 15 до 25 кДа (фракция 2). На основании анализа научных публикаций по свойствам ферментов, было сделано предположение, что хитиноподобные ферменты исследуемых микроорганизмов ассоциированы с фракцией 1, что было подтверждено экспериментально: после накопления фракций положительную реакцию на экзохитиназную активность показала только фракция 1.

Несмотря на различную природу хитиназ выделенных культур, диапазон ММ фракций, обладающих этой активностью, находится в пределах одного порядка — от 90 до 135 кДа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вселение крабов в холодное Баренцево море равнозначно внесению значительного количества хитина. В частности, для бентали всего Баренцева моря это означает увеличение биомассы хитина примерно в 2 раза. В районах, в которых образуются промысловые скопления камчатского краба и ведётся его активный промысел и переработка, биомасса хитина увеличивается в десятки раз.

На основании модельных экспериментов нами было рассчитано, что сброшенный в Баренцевом море панцирь ракообразных утилизируется примерно в течение 20–25 сут, а на утилизацию чистого хитина уходит около 200 сут, при условии сохранения видового и численного состава микроорганизмов грунта.

Исходя из полученных результатов, можно констатировать, что в экосистеме Баренцева моря происходит естественное развитие природных процессов. Гетеротрофный бактериобентос вполне справляется с поступающим хитином и проявляет значительную активность в его деградации. Бактериобентос играет важную роль в поддержании баланса хитина в Баренцевом море.

Проведенные исследования показали наличие хитин-расщепляющих бактерий в экосистеме Баренцева моря. Выделены микроорганизмы 4 родов *Rhodococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. и *Acinetobacter* sp., изучены хитиноподобная активность и фракционный состав белков культуральной жидкости этих микроорганизмов. Средняя ММ фракции белков, обладающих хитиноподобной активностью, определённая методами хроматографии и электрофореза составляет 90–135 кДа. Максимальная эндохитиназная активность наблюдалась у ферментов культуры микроорганизмов *Rhodococcus* sp. и практически отсутствовала у ферментов бактерий *Pseudomonas* sp. Наибольшая экзохитиназная активность отмечена у ферментов микроорганизмов *Bacillus* sp. и *Pseudomonas* sp.

ЛИТЕРАТУРА

- Байтаз В.А., Байтаз О.Н., Мишустина И.Е. 1996. Морфология клеток, численность и биомасса основных морфологических групп бактериопланктона Баренцева моря // Океанология. Т. 36. № 6. С. 883–887.
- Байтаз О.Н. 1990. Сравнительная характеристика количественных и продукционных показателей губы Дальнезеленецкая и юго-восточной части Баренцева моря // Экология и биологическая продуктивность Баренцева моря. М.: Наука. С. 78–87.
- Баканев, С.В., Павлов В.А. 2010. О моделировании динамики численности краба-стригуна опилио (*Chionoecetes opilio*) в Баренцевом море // Вопросы рыболовства. Т. 11. № 3 (43). С. 485–496.
- Галкин Ю.И. 1962. Ещё раз об акклиматизации камчатских крабов в Баренцевом море // Тр. ММБИ. Вып. 4. С. 252–253.
- Дробышева С.С. 1994. Эвфаузииды Баренцева моря и их роль в формировании промысловой рыбопродукции. Мурманск: Изд-во ПИНРО. 139 с.
- Жизнь и условия её существования в пелагиале Баренцева моря. 1985 / Гл. ред. Г.Г. Матишов. Апатиты: Кольский филиал АН СССР. 220 с.

- Зенкевич Л.А. 1956. Моря СССР, их фауна и флора. Изд. 2-е, доп. М.: Учпедгиз, 424 с.
- Лабинская А.С. 1978. Микробиология с техникой микробиологических исследований. Изд. 4-е, перераб. и доп. М.: Медицина. 394 с.
- Логинов О.Н., Мелентьев А.И., Бойко Т.Ф., Галимзянова Н.Ф., Свешникова Е.В., Силищев Н.Н., Актуганов Г.Э. 2006. Хитиноподобная активность бактерий рода *Pseudomonas* — потенциальных объектов агробιοтехнологий // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: Материалы Восьмой Международной конференции. М.: Изд-во ВНИРО. С. 293–296.
- Определитель бактерий Берджи. 1997. Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. В двух томах. М.: Мир. 432 с., 368 с. (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1994. Ed. By John G. Holt, Noel R. Kreig, Peter H.A. Sneath, James T. Staley and Stanley T. Williams. Philadelphia, Baltimore et al.: Lippincott Williams & Wilkins. 799 p.)
- Практическая химия белка. 1989. Под ред. А. Дарбре. М.: Мир. 623 с. (Practical Protein Chemistry. A Handbook. 1987. Ed. By A. Darbre. Chichester, New York et al.: John Wiley & Sons. 620 p.)
- Руководство по химическому анализу морских и пресных вод при экологическом мониторинге рыбохозяйственных водоёмов и перспективных для промысла районов Мирового океана. 2003. М.: Изд-во ВНИРО. 202 с.
- Рязанова Т.В. 2005. Гистопатологические изменения при панцирной болезни у камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* (Tilesius, 1815) // Биология моря. Т. 31. № 6. С. 421–428.
- Рязанова Т.В. 2006. Патологические изменения органов и тканей у краба-стригуна опилио (*Chionoecetes opilio*) на Западно-Камчатском шельфе Охотского моря // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и Северо-западной части Тихого океана. Вып. 8. С. 207–216.
- Состояние сырьевых биологических ресурсов Баренцева моря и Северной Атлантики в 2015 г. 2015. / Отв. ред. Е.А. Шамрай. Мурманск: Изд-во ПИНРО. 96 с.
- Стексова В.В. 2003. Морфофизиологическое состояние краба-стригуна опилио (*Chionoecetes opilio*; Brachyura: Majidae) в водах Сахалина в связи с патогенетическим воздействием на него некоторых организмов эпibiоза. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Южно-Сахалинск. 24 с.
- Шубаков А.А., Кучерявых П.С. 2004. Хитиноподобная активность мицелиальных грибов // Прикл. биохимия и микробиология. Т. 40. № 5. С. 517–519.
- Anisimova N.A., Jørgensen L.L., Lyubin P.A., Manushin I.E. 2011. Benthos. In The Barents Sea — Ecosystem, Resources, Management. Half a century of Russian-Norwegian cooperation. Ed. by T. Jakobsen and V. Ozhigin. Tapir Academic Press, Trondheim P. 121–159.
- Benhalima K., Moriyasu M., Wade E., Hebert M. 1998. Exoskeletal lesions in the male snow crab *Chionoecetes opilio* (Brachyura: Majidae) in the southern Gulf of St. Lawrence // Can. J. Zool. Vol. 76. No. 4. P. 601–608.
- Declaire M., De Cat W., Tang V.H., Maraite H., Minier M., Goffic F. Le, Gullino M.L., Huynh N. Van. 1996. Determination of endo- and exochitinase activities of *Serratia marcescens* in relation to the culture media composition and comparison of their antifungal properties // Chitin Enzymology. Ed. by R.A.A. Muzzarelli. Vol. 2. Grottammare, Italy: Atec Edizioni. P. 165–169.
- Hood M.A., Meyers S.P. Rates of chitin degradation in an estuarine environment // J. Oceanogr. Soc. Japan. 1977. Vol. 33. No 6. P. 328–334.
- Kang H., Freeman C., Park S.S., Chun J. 2005. N-Acetylglucosaminidase Activities in wetlands: a global survey // Hydrobiologia. Volume 532. № 1. P. 103–110.
- Keyhani N.O., Roseman S. 1999. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria // Biochim. Biophys. Acta Gen. Sub. Vol. 1473. № 1. P. 108–122.
- Poulicek M., Jeuniaux C. 1989. Chitin and chitosan / Ed. by G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, P. Sandford. London: Elsevier Applied Science. P. 151–155.
- Reissig J.L., Strominger J.L., Leloir L.F. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars // The Journal of Biological Chemistry. Vol. 217. № 2. P. 959–966.
- Yu C., Lee A.M., Bassler B.L., Roseman S. 1991. Chitin utilization by marine bacteria. A physiological function for bacterial adhesion to immobilized carbohydrates // J. Biol. Chem. Vol. 266. № 36. P. 24260–24275.

REFERENCES

- Bajtaž V.A., Bajtaž O.N., Mishustina I.E. 1996. Morfologiya kletok, chislennost' i biomassa osnovnykh morfologicheskikh grupp bakterioplanktona Barentsya morya [Cell morphology, abundance, and biomass of the main morphological groups of the Barents Sea bacterioplankton] // Okeanologiya. T. 36. № 6. S. 883–887.
- Bajtaž O.N. 1990. Sravnitel'naya kharakteristika kolichestvennykh i produktsionnykh pokazatelej guby Dal'nezelenetskaya i yugo-vostochnoj chasti Barentseva morya [Comparative analysis of quantitative

- and production indices of Dalnezelenetskaya Bay and the southeastern Barents Sea] // *Ehkologiya i biologicheskaya produktivnost' Barentseva morya*. M.: Nauka. S. 78–87.
- Bakanev, S.V., Pavlov V.A. 2010. O modelirovanii dinamiki chislennosti kraba-striguna opilio (*Chionoecetes opilio*) v Barentsevom more [Modelling the abundance dynamics of snow crab (*Chionoecetes opilio*) in the Barents Sea] // *Voprosy rybolovstva*. T. 11. № 3 (43). S. 485–496.
- Galkin Yu.I. 1962. Eshhe raz ob akklimatizatsii kamchatskikh krabov v Barentsevom more [Acclimatization of the red king crab in the Barents Sea revisited] // *Tr. MMBI*. Vyp. 4. S. 252–253.
- Drobysheva S.S. 1994. Ehfauziidy Barentseva morya i ikh rol' v formirovanii promyslovoj ryboproduksii [The Barents Sea euphausiids and their role in formation of commercially valuable biological resource]. Murmansk: Izd-vo PINRO. 139 s.
- Zhizn' i usloviya ee sushhestvovaniya v pelagiale Barentseva moray [Life and conditions of its existence in the pelagial of the Barents Sea]. 1985 / Gl. red. G.G. Matishov. Apatity: Kol'skiy filial AN SSSR. 220 s.
- Zenkevich L.A. 1956. Morya SSSR, ikh fauna i flora [Seas of the USSR, Their Fauna and Flora]. Izd. 2-e, dop. M.: Uchpedgiz, 424 s.
- Labinskaya A.S. 1978. Mikrobiologiya s tekhnikoj mikrobiologicheskikh issledovanij [Microbiology with technology of microbiological researches]. Izd. 4-e, pererab. i dop. M.: Meditsina. 394 s.
- Loginov O.N., Melent'ev A.I., Bojko T.F., Galimzyanova N.F., Sveshnikova E.V., Silishhev N.N., Aktuganov G. Eh. 2006. Khitinoliticheskaya aktivnost' bakterij roda *Pseudomonas* — potentsial'nykh ob"ektov agrobiotekhnologii [Chitinolytic activity of bacteria from genus *Pseudomonas* which are potential applicants in agricultural biotechnology] // *Sovremennye perspektivy v issledovanii khitina i khitozana: Materialy Vos'moj Mezhdunarodnoj konferentsii*. M.: Izd-vo VNIRO. S. 293–296.
- Rukovodstvo po khimicheskomu analizu morskikh i presnykh vod pri ehkologicheskom monitoringe rybokhozyajstvennykh vodoemov i perspektivnykh dlya promysla rajonov Mirovogo okeana [The guide of the chemical analysis of sea and fresh waters at environmental monitoring of fishery reservoirs and regions of the World Ocean, perspective for trade]. 2003. M.: Izd-vo VNIRO. 202 s.
- Ryazanova T.V. 2005. Gistopatologicheskie izmeneniya pri pantsirnoj bolezni u kamchatskogo kraba *Paralithodes camtschaticus* (Tilesius, 1815) [Histopathological changes associated with shell disease in the red king crab *Paralithodes camtschaticus* (Tilesius, 1815)] // *Biologiya morya*. T. 31. № 6. S. 421–428.
- Ryazanova T.V. 2006. Patologicheskie izmeneniya organov i tkanej u kraba-striguna opilio (*Chionoecetes opilio*) na Zapadno-Kamchatskom shel'fe Okhotskogo morya [Histopathological changes among the snow crabs (*Chionoecetes opilio*) on the westkamchatkan shelf of the Okhotsk sea] // *Issledovaniya vodnykh biologicheskikh resursov Kamchatki i Severo-zapadnoj chasti Tikhogo okeana*. Vyp. 8. S. 207–216.
- Sostoyanie syr'evykh biologicheskikh resursov Barentseva morya i Severnoj Atlantiki v 2015 g. 2015. [State of biological resources in the Barents Sea and the North Atlantic in 2015. 2015] / *Otv. red. E.A. Shamraj*. Murmansk: Izd-vo PINRO. 96 s.
- Steksova V.V. 2003. Morfofiziologicheskoe sostoyanie kraba-striguna opilio (*Chionoecetes opilio*; Brachyura: Majidae) v vodakh Sakhalina v svyazi s patogeneticheskim vozdejstviem na nego nekotorykh organizmov ehpiobioza [Morphophysiological characteristics of the snow crab in Sakhalin waters under the pathogenetic influence of several epibionts]. Avtoref. diss. ... kand. biol. nauk. Yuzhno-Sakhalinsk. 24 s.
- Shubakov A.A., Kucheryavykh P.S. 2004. Khitinoliticheskaya aktivnost' mitselial'nykh gribov [Chitinolytic Activity of Filamentous Fungi] // *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya*. T.40. № 5. S. 517–519.

Поступила в редакцию 28.03.16 г.
Принята после рецензии 19.07.16 г.

Ecological and biochemical aspects of biotransformation of chitin in the Barents Sea

N.V. Shumskaya, O.R. Uzbekova, V. YU. Novikov, V.A. Mukhin

Knipovich Polar Research Institute of Marine Fisheries and Oceanography (FSBSI "PINRO"),
Murmansk

The composition of chitin-containing organisms in the Barents Sea benthic communities expanded and changed considerably in the last decades, mainly, due to introduced large crustaceans — red king crab *Paralithodes camtschaticus* and snow crab *Chionoecetes opilio*. For the whole Barents Sea benthos this means an almost two-fold increase of the chitin biomass. The biomass of chitin increases by tens of times in areas where commercial concentrations of red king crab are present and its intense fishery and processing take place. The ecosystem of the Barents Sea is capable of utilizing chitin slowly, however, danger exists that a considerable amount of this substance is accumulated in the substrate of the Barents Sea and this could cause dramatic changes in benthos communities and then in all biotopes of the Barents Sea. If the system responds intensely (rapid growth of chitin-reducing bacteria biomass), adverse effects are possible in the form of outbreaks of bacterial diseases in crustaceans, which could also lead to significant ecological changes. Simulation exercises have suggested that crustacea carapace discarded into the Barents Sea is utilized over about 20–25 days, and about 200 days are required for utilization of pure chitin provided, that species composition and abundance of microorganisms in the substrate remain unchanged. Microorganisms such as *Rhodococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. and *Acinetobacter* sp. play a key role in biotransformation of chitin. Cultures of these organisms were identified in substrate in different areas of the Barents Sea. From the cultural liquid of analyzed bacteria fermental complexes showing endochitinase and exochitinase activity were isolated. The average molecular weight of the protein fraction having chitinolytic activity was 90–135 kDa.

Key words: chitin-reducing bacteria, exo- and endochitinase, introduced crabs, chitin balance in the Barents Sea.