БИОХИМИЯ, 1997, том 62, вып. 7, с. 842 - 849

УДК 577.152.1

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММА *Bacillus* sp. FTU И ИЗУЧЕНИЕ ГОМОЛОГИИ ОКСИДАЗ *caa*$_3$-ТИПА

© 1997 г. В.А. Гринкевич[1], А.М. Лысенко[2], М.С. Мунтян[3]*, Е.В. Скрипникова[3], Э.К. Африкян[4]

[1]*Кафедра биоорганической химии Биологического факультета МГУ им. МВ. Ломоносова, 119899 Москва; электронная почта: grin@ecol.msu.ru*

[2]*Институт микробиологии РАН, 117811 Москва, просп. 60-летия Октября, 7; факс: (095) 135-6530*

[3]*Институт физико-химической биологии им. А.И.Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119899 Москва; факс: (095)939-3181, электронная почта: mount@cytox.genebee.msu.su*

[4]*Институт микробиологии Национальной академии наук Армении, Абовян; электронная почта: microbio@pnas.sci.am*

Поступила в редакцию 05.01.97
После доработки 07.04.97

Даны культурально-морфологическая и геномная характеристики алкало- и галотолерантного штамма *Bacillus* sp. FTU; проведено его сравнение с рядом представителей рода *Bacillus*. Методом ДНК-ДНК-гибридизации установлено, что штаммы *Bacillus halodurans* DSM 497 и DSM 2513 и *Bacillus* sp. FTU по гомологии ДНК находятся в пределах одного вида. Предложено *Bacillus* sp. FTU переименовать в *Bacillus halodurans* FTU. Установлена N-концевая аминокислотная последовательность субъединиц I и II терминальной цитохром *c*-оксидазы *caa*$_3$-типа из *B.halodurans* FTU. По N-концевым последовательностям фермент имеет высокую степень гомологии с оксидазой *caa*$_3$-типа из алкалофильной бактерии *Bacillus firmus* OF4 (по субъединицам I и II гомология превышает 90 и 96% соответственно). Предполагается, что щелочная среда обитания отразилась на степени гомологии терминальных оксидаз исследованной бактерии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Bacillus halodurans, Bacillus alcalophilus, Bacillus firmus,* оксидаза *caa*$_3$-типа, N-концевая аминокислотная последовательность, содержание ГЦ-пар, галотолерантность, алкалотолерантность.

В течение ряда лет нами изучались особенности энергетики выделенного в нашей лаборатории алкало- и галотолерантного штамма *Bacillus* sp. FTU. Из мембран этой бактерии выделены две терминальные оксидазы *caa*$_3$ [1] и *bb*-типа [2]. Оксидаза *bb*-типа охарактеризована относительно недавно. По предварительным данным фермент функционирует как непротонный (предположительно натриевый) преобразователь энергии и необходим при росте бактерий в экстремальных условиях. Оксидазы *caa*$_3$-типа являются представителями H^+-переносящих оксидаз с каталитическим гем-медным биядерным центром, включающих терминальные оксидазы высших организмов и бактерий. У высших организмов гомология H^+-переносящих оксидаз достигает высокой степени: по субъединице I - ~ 75%, по субъединице II - до 58%. Аналогичные показатели у бактерий составляют ~ 40 и 25% соответственно. Однако данных об особенностях этих ферментов у объектов, обитающих в щелочных средах, до настоящего времени в литературе не было.

Частичная характеристика *Bacillus* sp. FTU приведена в работах [3, 4], его систематическое положение определено только до рода. Штамм обнаруживает преимущественный рост при pH 9, при pH ниже 7,5 его рост подавляется. Эти факты указывают на возможное родство *Bacillus* sp. FTU с представителями алкалофильных бацилл.

Как самостоятельный вид *Bacillus alcalophilus* был введен Ведером [5] в 1934 г., когда он выделил из фекалий человека 16 алкалофильных штаммов бактерий, образующих эндоспоры. Эти штаммы проявляли способность к росту только в средах с pH выше 7 и для нормального роста требовали значений pH 8,6-10.

В 1973 г. Бойером и соавт. было предложено алкалофильные штаммы рода *Bacillus* ATCC 27557 (DSM 497) и ATCC 21591 (DSM 2513) выделить из вида *B. alcalophilus* в отдельный подвид *B. alcalophilus* subsp. *halodurans* с типовым штаммом подвида ATCC 27557 [6]. При этом штамм ATCC 27647 (DSM 485), использовавшийся ранее как типовой для вида *B.alcalophilus,* был отнесен к подвиду *B. alcalophilus*

*Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

раммы России «Новейшие методы биоинженерии» (грант № 03.0001Н - 316) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 96-04-50-938).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muntyan, M.S., Skripnikova, E.V., and Ustiyan, V.S. (1992) EBEC Rept., 7, 69.
2. Muntyan, M.S., Ustiyan, V.S., Viryasov, M.B., and Skulachev, V.P. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **207,** 55-61.
3. Верховская М.Л., Семейкина А.Л., Скулачев В.П., Булыгина Е.С., Чумаков К.М. (1989) *Биохимия,* 54, 1457-1466.
4. Semeykina, A.L., Skulachev, V.P., Verkhovskaya, M.L., Bulygina, E.S., and Chumakov, K.M. (1989) *Eur. J. Bio chem.* **,183,** 671-678.
5. Vedder, A. (1934) *Antonie van Leevenhoek J.Microbiol. Serol.,*\, 143-147.
6. Boyer, E.W., Ingle, M.B., and Mercer, G.D. (1973) *Int. J.Syst. Bacterioi,* **23,** 238-242.
7. De Ley, J. (1978) in *Proc. IV Int. Conf. Plant Pat hoi. Bacterioi.* (Angers), Gibert-Clarey, France, pp. 347-357.
8. Fritze, D., Flossdorf, J., and Claus, D. (1990) *Int. J. Syst. Bacterioi.,* 40,92-97.
9. Пешков М.А. (1955) *Цитология бактерий,* Изд-во АН СССР, Москва.
10. Миллер Дж. (1976) *Эксперименты в молекулярной генетике,* Мир, Москва.
11. MarmurJ. (1961)7. *Mol. ВЫ..* 3, 208-218.
12. Owen, R.J., Hill, L.R., and Lapage, S.P. (1969) *Biopolymers,* 7, 503-516.
13. De Ley, J., Cattoir, H., and Reynaerts, A. (1970) *Eur. J. Biochem.* ,12, 133-142.
14. Лысенко А.М., Богданова Т.И. (1986) *Микробиология,* **55** (3), 522-524.
15. Гринкевич В.А., Арзамазова Н.М., Потапенко Н.А., Гринкевич Х.А., Кравченко З.Б., Фейгина М.Ю., Алданова Н.А. (1979) *Биоорган, химия,* 5, 1757-1774.
16. Horikoshi, K., and Akiba, T. (1982) *Alkalophilic Microor ganisms.,* Japan Scientific Societies Press, Tokyo and Sprin ger- Verlag, Berlin.
17. Quirk, P.G., Hicks, D.B., and Krulwich, T.A. (1993) *J.BiolChem.,* **268,** 678-685.
18. Ishizuka, M., Machida, K., Shimada, S., Mogi, A., Tsuchiya, T., Ohmori, T., Souma, Y., Gonda, M., and Sone, N. (1990)7. *Biochem.,* **108,** 866-873.
19. Saraste, M., Metso, T., Nakari, T., Jalli, T., Lauraeus, M., and van der Oost, J. (1991) *Eur. J. Biochem.,* **195,** 517-525.
20. Mater, M.W., Springer, P., Hensel, S., Buse, G., and Fee, J.A. (1993) *J. Biol. Chem.,* **268,** 5395-5408.
21. Raitio, M, Jalli, T., and Saraste, M. (1987) *EMBOJ.,* 6, 2825-2833.
22. Santana, M., Kunst, F., Hullo, M.F., Rapoport, G., Danchin, A., and Glaser, P. (1992) *J. Biol. Chem.,* **267,** 10225-10231.
23. Priest, F.G. (1989) in *Bacillus* (Harwood, C.R., ed.), Ple num Press, New York, pp.27-56.
24. Claus, D., and Berkeley, R.C.W. (1986) in *Bergey 's Manual of Syst. Bad.,* Vol. 2(Sneath, P.H.A., ed.), Bergey's Manual Trust, Williams and Wilkins, Baltimore, pp.1105-1 139.
25. Chislett, M.E., and Kushner, D.J. *(\96\)J.Gen Microbioi,* 24, 187-190.
26. Kusano, T., Kuge, S., Sakamoto, J., Noguchi, S., and Sone, N. (1996) *Biochim. Biophys. Ada,* **1273,** 129-138.
27. Laureus, M., Haltia, T., Saraste, M., and Wikstrom, M. (1991) *Eur. J.Biochem.,* **197,** 599-685.
28. van der Oost, J., von Wachenfeldt, C, Hederstedt, L., and Saraste, M. (1991) *Mol. Microbioi.,* 5, 2063-2072.
29. Garcia-Horsman, J., Barquera, B., and Escamilla, J.E. (1991) *Eur. J. Biochem.,* **199,** 761-768.

IDENTIFICATION OF *Bacillus sp.* FTU STRAIN AND THE STUDY OF THE *caa*$_3$-*TYPE OXIDASE HOMOLOGY*

V.A. Grinkevich[1], A.M. Lysenko[2], M.S. Muntyan[3], E.V. Skripnikova[3], E.K. Afrikyan[4]

[1]*School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119899, Russia; E-mail: grin@ecol.msu.ru*

[2]*Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, prospect 60-letiya Oktyabrya 7/1, Moscow, 117811, Russia; fax: (7-095)135-6530*

[3]*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119899, Russia; fax: (7-095)939-3181, E-mail: mount@cytox.genebee.msu.su,*

[4]*Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Armenia, Abovian, 378510, Armenia; E-mail: microbio@pnas.sci.am*

Submitted January 5, 1997
Revision submitted April 7, 1997

The culture, morphology, and genome of alkalo- and halotolerant bacterial strain *Bacillus sp.* FTU were characterized; the strain is compared to other representatives of *Bacillus* gender. The DNA-DNA-hybridization and DNA homology data indicate that the strains of *Bacillus halodurans* DSM 497 and DSM 2513 and *Bacillus sp.* FTU belong to the same species. Hence, *Bacillus sp.* FTU can be renamed to *Bacillus halodurans* FTU. The N-terminal amino acid fragments of the subunits I and II of the terminal cytochrome *c* oxidase of the *caa*$_3$-type of *B. halodurans* FTU were sequenced. The N-terminal fragments of this enzyme and of the *caa*$_3$-type oxidase of alkalophilic *Bacillus firmus* OF4 are highly homologous (homology of subunits 1 and II is over 90% and over 96%, respectively). Such high homology of terminal oxidases of these bacteria can be due to alkaline medium.

KEY WORDS: *Bacillus halodurans, Bacillus alcalophilus, Bacillus firmus, caa*$_3$-type oxidase, N-terminal amino acid sequence, GC-content, halotolerance, alkalotolerance.