

ANALIZA BIOCHIMICĂ A ACTIVITĂȚII CATALAZEI LA UN GRUP DE BACTERII IZOLATE DIN APA LACURILOR „LA IZVOR”

BIOCHEMICAL ANALYSIS OF CATALASE ACTIVITY IN A GROUP OF BACTERIA ISOLATED FROM THE WATER OF “LA IZVOR” LAKES

Ludmila BALAN, ORCID: 0000-0002-8319-6808

Valerina SLANINA, ORCID: 0000-0002-9833-7933,

Nina BOGDAN-GOLUBI, ORCID: 0000-0003-2199-4414,

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al UTM, Chișinău, R. Moldova

CZU: 574.5:579.68

e-mail: ludmila.batir@imb.utm.md

e-mail: valerina.slanina@imb.utm.md

e-mail: nina.bogdan@imb.utm.md

Determination of bacterial enzyme activity is widely studied in recent years both through biochemical and molecular analysis. Catalase, peroxidase and superoxide dismutase are considered an important antioxidant enzymes that prevents cellular damage by the action of free radicals. The researches have been carried out to study catalase activity in biomass of some bacterial strains isolated from the lakes of the “La Izvor” park. The results of the study show that out of 20 strains 17 are catalase-producing bacteria, where Bacillus safensis CNMN-BB-26 and Pseudomonas poae CNMN-Ps-09 are active strains with values of 228,94 and 270,16 mmol/min/mg protein, respectively, Bacillus velezensis CNMN-BB-14 produced the highest value of 380,68 mmol/min/mg protein.

Cuvinte-cheie: catalase activity, bacteria, protein, spectrophotometric analysis

INTRODUCERE

Cererea industrială pentru enzimele microbiene a apărut pe piață cu cea mai rapidă creștere, iar cererea catalazei este una dintre ele, datorită importanței pe care o are în utilizarea la degradarea peroxidului de hidrogen. Catalaza este o enzimă antioxidantă importantă care distruge peroxidul de hidrogen format în urma metabolismului celular normal, cu formarea de apă și oxigen, prevenind peroxidarea lipidică a membranelor și deteriorarea celulelor. De asemenea, catalaza este una dintre enzimele industriale importante folosite în metodele diagnostice și analitice sub formă de biomarkeri și biosenzori pe lângă aplicațiile enorme în domeniul textilelor, alimentației și cel farmaceutic [1, 2].

Catalaza are o masă moleculară egală cu 250 kDa și constă din patru grupuri de hemoproteine. Ca și alte enzime antioxidante, catalaza este produsă și de un spectru larg de organisme procariote și eucariote. Aceasta este o enzimă intracelulară care a fost descoperită la majoritatea anaerobilor facultativi și la toate bacteriile aerobe, dar nu este

prezentă la anaerobii obligatorii [3, 4]. Catalaza este al doilea cel mai abundent anti-oxidant enzimatic (după superoxid-dismutază), care atenuează îmbătrânirea, cataracta, cancerul, deficiența nutrițională, ateroscleroza și diabetul [4].

Această enzimă omniprezentă, găsită în trei forme, a fost utilizată pentru o serie de aplicații industriale, de diagnostic și medicale. Este produsă și purificată dintr-un număr de microorganisme, plante și animale [1, 4, 5]. Peroxidul de hidrogen (H_2O_2), un oxidant puternic, este pe larg folosit ca reactiv de spălare în fabricile de semiconductori și ca agent de albire în industriile textile, astfel, apele industriale uzate trebuie tratate și eliminat H_2O_2 deoarece afectează negativ atât flora cât și fauna înconjurătoare [1, 7]. Tratarea cu substanțe chimice are un șir de dezavantaje, datorită toxicității acestora care la fel mai dăunează și nămolului activ. Abordarea care implică degradarea enzimatică a H_2O_2 cu ajutorul catalazei este o alternativă mai sigură față de tratamentul chimic [1].

Astfel, în ultimii ani au fost efectuate mai multe cercetări cu privire la activitatea enzimatică a unor bacterii atât prin analize biochimice cât și moleculare. Astfel, enzimele antioxidante precum catalaza, peroxidaza și superoxid-dismutaza joacă un rol important în mai multe procese microbiene independente de stresul oxidativ [8].

Cercetările asupra tulpinii *Bacillus subtilis* au permis de a stabili că, s-a găsit o activitate vegetativă a catalazei secretată de celulele acesteia în timpul fazei de staționare a creșterii, ceea ce are o importanță esențială în protecția completă a celulelor împotriva stresului oxidativ [8].

În ultimii ani ne-am axat pe cercetări ce țin de izolarea tulpinilor noi de microorganisme din lacurile parcului „La Izvor” din mun. Chișinău, în vederea selectării celor de interes biotehnologic și depozitarea acestora în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene (CNMN) din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie (IMB) al Universității Tehnice a Moldovei (UTM). Astfel, în urma cercetărilor efectuate au fost izolate mai multe grupuri de microorganisme, din care și 65 tulpini noi de bacterii neapatogene, din acestea 20 tulpini prezintă interes datorită activității antifugice și antimicrobiene pronunțate dar și a activității enzimatică ca cea amilolitică, a catalazei, lipazei și celulazei.

Astfel, scopul cercetărilor noastre a constat în analiza biochimică a activității catalazei prin determinarea cantitativă a acesteia în biomasa unor tulpini de bacterii izolate din lacurile parcului „La Izvor”.

MATERIALE ȘI METODE

În studiu au fost incluse 20 tulpini de bacterii izolate în urma evaluării biodiversității acvatice din apa, nămolul și biofilmele formate pe lacurile din parcul „La Izvor”, probele fiind recoltate din diferite sectoare, fiind selectate cele mai active tulpini ce prezintă interes biotehnologic care au fost depozitate în CNMN) din cadrul IMB al UTM: *Pseudomonas poae* CNMN-Ps-09, *Bacillus velezensis* CNMN-BB-12, *Bacillus velezensis* CNMN-BB-13, *Bacillus velezensis* CNMN-BB-14, *Bacillus velezensis* CNMN-BB-15, *Bacillus velezensis* CNMN-BB-16, *Bacillus velezensis* CNMN-BB-17, *Bacil-*

lus velezensis CNMN-BB-18, *Micrococcus yunnanensis* CNMN-BM-19, *Micrococcus yunnanensis* CNMN-BM-20, *Paenibacillus pabuli* CNMN-BP-21, *Planococcus ruber* CNMN-BP-22, *Peribacillus simplex* CNMN-BP-23, *Planococcus chinensis* CNMN-BP-24, *Bacillus safensis* CNMN-BB-25, *Bacillus safensis* CNMN-BB-26, *Bacillus safensis* CNMN-BB-27, *Peribacillus simplex* CNMN-BP-28, *Bacillus rugosus* CNMN-BB-29, *Micrococcus aloeverae* CNMN-BM-30.

În calitate de mediu nutritiv pentru cultivarea și creșterea tulpinilor menționate, a fost utilizat agarul nutritiv. Cultivarea s-a efectuat la temperatura de $+30\pm 1^\circ\text{C}$, timp de 24 – 48 ore, iar biomasa bacteriilor a fost determinată gravimetric [9, 10].

Activitatea catalazei (CAT) s-a determinat cu utilizarea metodei spectrofotometrice la o lungime de undă de 240 nm, care se bazează pe capacitatea peroxidului de hidrogen de a interacționa cu molibdatul de amoniu, formând un complex colorat stabil [11]. Activitatea catalazei se exprimă în mmol/min/mg de proteină, datorită determinării cantitative a produsului reacției într-o unitate de timp raportată la 1 mg de proteină.

Conținutul de proteine a fost determinat conform metodei propuse de Lowry [12].

Prelucrarea statistică a rezultatelor a fost efectuată utilizând *Microsoft Excel 2010*. Rezultatele au fost exprimate prin calcularea mediei, deviației standard și a intervalului de încredere pentru o medie a trei repetări. Toate diferențele au fost considerate semnificative statistic pentru $P\leq 0,05$.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Cercetările efectuate de către echipa noastră de cercetători au constat în, determinarea cantitativă a activității catalazei la un șir de tulpini de bacterii izolate în anii precedenți din apa lacurilor din parcul “La Izvor”, în vederea depistării celor mai active ce prezintă interes biotehnologic. Determinarea activității catalazei a fost efectuată în faza de creștere exponențială (logaritmică), adică după 48 ore de cultivare pe mediul agar nutritiv, deoarece aceasta este faza în care creșterea masei de celule poate fi determinată cantitativ prin dublarea numărului acestora într-o unitate de timp.

Astfel, în urma cercetărilor efectuate asupra determinării cantitative a activității catalazei în biomasa unor tulpini de bacterii, s-a stabilit că, din totalul de 20 de tulpini incluse în studiu, 3 posedă cea mai înaltă activitate a CAT de cca 228,94 și 270,16 mmol/min/mg proteină, pentru *Bacillus safensis* CNMN-BB-26 și *Pseudomonas poae* CNMN-Ps-09, respectiv, și de cca 380,68 mmol/min/mg proteină pentru *Bacillus velezensis* CNMN-BB-14 (Fig. 1).

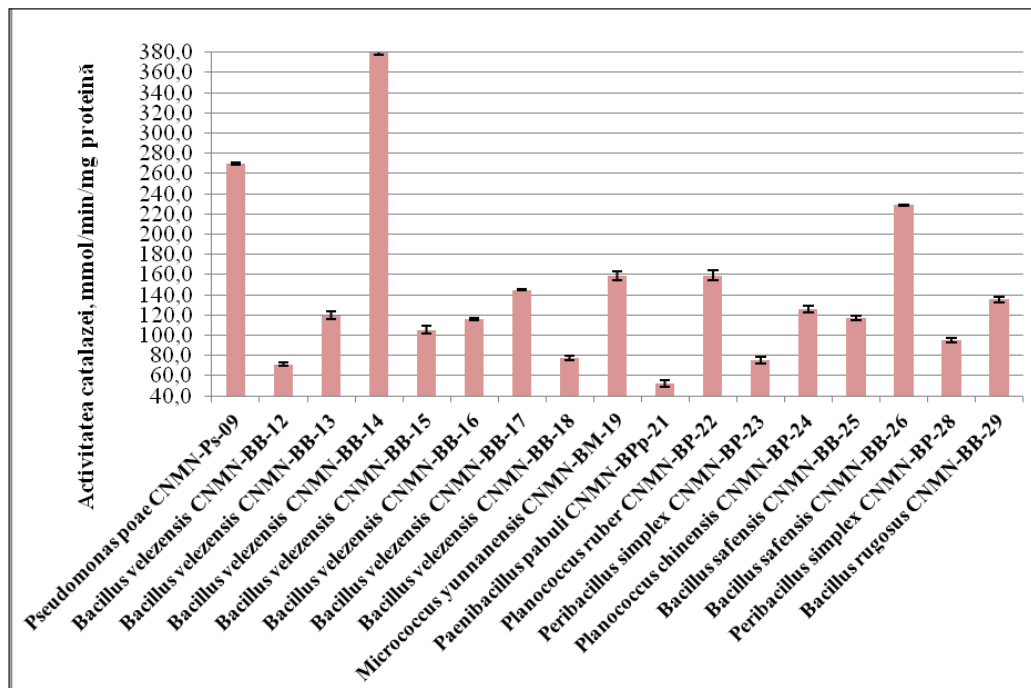


Figura 1. Activitatea catalazei în biomasa unor tulpini de bacterii, după 48 ore de cultivare pe mediul agar nutritiv

Pentru alte 10 tulpini incluse în cercetare, activitatea catalazei variază între 94,99 – 159,37 mmol/min/mg proteină, iar pentru 4 tulpini activitatea catalazei variază între 52,18 – 77,51 mmol/min/mg proteină. De asemenea, s-a stabilit că 3 dintre tulpinile studiate cum ar fi: *Micrococcus yunnanensis* CNMN-BM-20, *Bacillus safensis* CNMN-BB-27 și *Micrococcus aloeverae* CNMN-BM-30, practic nu posedă activitate antioxidantă deoarece conținutul activității catalazei este la un nivel extrem de scăzut, în schimb aceste tulpini posedă activitate antimicrobiană pronunțată asupra tulpinilor de fungi fitopatogeni.

CONCLUZII

În rezultatul cercetărilor putem concluziona că, din 20 tulpini de bacterii izolate din lacurile parcului “La Izvor”, activitatea catalazei se manifestă la 17 din ele, cea mai sporită fiind la tulpinile *Bacillus safensis* CNMN-BB-26 și *Pseudomonas poae* CNMN-Ps-09, ce constituie 228,94 și 270,16 mmol/min/mg proteină, respectiv, și la *Bacillus velezensis* CNMN-BB-14 care are cea mai înaltă valoare de cca 380,68 mmol/min/mg proteină. Aceste tulpini pot fi utilizate ca obiecte biotehnologice cu un înalt potențial biosintetic și activitate enzimatică sporită.

Referințe:

1. BALJINDER, S.K., BALWINDER, S.S. Tailoring nutritional and process variables for hyperproduction of catalase from a novel isolated bacterium *Geobacillus* sp. BSS-7. In: *Kauldhar and Sooch Microb Cell Fact.* 2016. vol. 15, nr. 7, p.1-16. DOI 10.1186/s12934-016-0410-1.
2. EFREMOVA, N., CHISELIȚA, O., CHISELIȚA, N., BEȘLIU, A., TOFAN, E., LOZAN, A., DANILIȘ, M. Activitatea enzimatică a unor extracte din biomasa levurilor deșeurilor industriei de bere. In: *Studia Universitatis Moldaviae.* 2021. nr.1(141), p. 121-126.
3. SWITALA, J., et al. Diversity of properties among catalases. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 2002. vol. 401, p.145-154.
4. MAHMOUD, H.H. Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues. In: *BMC Biochemistry.* 2018. vol. 19, nr. 7, p. 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12858-018-0097-5>.
5. CHELIKANI, P., FITA, .I, LOEWEN, P.C. Diversity of structures and properties among catalases. In: *Cell Mol Life Sci.* 2004. vol. 61, p.192–208.
6. SOOCH, BS., KAULDHAR, BS., PURI, M. Recent insights into microbial catalases: isolation, production and purification. In: *Biotechnol Adv.* 2014. vol. 32, p.1429–1447.
7. XENOPOULOS, MA., BIRD, DF. Effect of acute exposure to hydrogen peroxide on the production of phytoplankton and bacterioplankton in a mesohumic lake. In: *Photochem Photobio.* 1997. vol. 66, nr. 4, p.471–478.
8. NACLERIO, G., BACCIGALUPI, L., CARUSO, C., et. al. *Bacillus subtilis* Vegetative Catalase Is an Extracellular Enzyme. In: *Applied and Environmental Microbiology.* 1995. vol. 61, nr. 12, p.4471-4473.
9. LIU, H.Z., QIANG, W., YUAN, Y.L., FANG, F. Statistical optimization of culture media and conditions for production of mannan by *S. cerevisiae*. In: *Biotech. and Bioprocess Engineering.* 2009. vol. 14, p.577-583.
10. ZARNEA, G.R., MIHAILESCU, S. Principii și tehnici de microbiologie generală. București: 1992.
11. KOMINA, A.V., KOROSTILEVA, K.A., GYRYLOVA, S.N., BELONOGOV, R.N., RUKSHA, T.G. Interaction Between Single Nucleotide Polymorphism in Catalase Gene and Catalase Activity Under the Conditions of Oxidative Stress. In: *Physiol. Res.* 2012. vol. 61, p.655-658.
12. LOWRY, O., ROSEBOUG, N., FARR, A. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. In: *Journal of Biological Chemistry.* 1951. vol. 193, p.265-275.