

А.Ю. Чеботарев, А.С. Гордиенко, И.К. Курдиш

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина*

ОСОБЕННОСТИ РОСТА *BACILLUS SUBTILIS* И СТРЕПТОМИЦИНУСТОЙЧИВОГО МУТАНТА В СРЕДЕ С САПОНИТОМ

*Исследовано влияние дисперсного сапонита на ростовую активность *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 и его стрептомицинустойчивого мутанта. Эффективность данного процесса зависит как от содержания дисперсного материала, так и фосфата в среде. Установлено, что при культивировании *B. subtilis* в среде, содержащей 0,6 г/л PO_4^{3-} , наблюдалось стимулирование роста бактерий этим минералом, а при более низких концентрациях (0,1 г/л PO_4^{3-}) имеет место снижение ростовой активности культуры. В то же время для стрептомицинустойчивого мутанта показано увеличение ростовой активности в среде, содержащей до 1,0 г/л сапонита, не зависимо от концентрации фосфата. Показано, что данный эффект является следствием однотипности свойств поверхности стрептомицинустойчивого мутанта и подобный родительскому штамму при концентрации 0,6 г/л PO_4^{3-} .*

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, стрептомицинустойчивый мутант, культивирование, микроэлектрофорез, сапонит.

Большинство микроорганизмов в природных условиях функционирует в контакте с твёрдыми поверхностями [4]. При этом, очевидно, нахождение микроорганизмов либо в прикреплённом, либо в свободном состоянии является следствием различных процессов и определяется условиями окружающей среды.

Известно, что внесение твёрдых материалов различной природы и степени дисперсности в среду культивирования бактерий может заметно влиять на их функционирование, изменяя физиолого-биохимические свойства, в том числе увеличивая скорость роста [6]. Механизмы данного явления изучены недостаточно и чаще всего находятся на уровне предположений. В этих моделях определённая роль отводится свойствам поверхности как твёрдых частиц, так и клеток [14].

Среди дисперсных материалов определённый интерес вызывает сапонит. Сапонит используют в сельском хозяйстве как комплексную минеральную кормовую добавку [12].

Цель работы – исследовать влияние сапонита на рост *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 и его стрептомицинустойчивого мутанта.

Материалы и методы. Объектом исследования был штамм *B. subtilis* ИМВ В-7023, выделенный Рой А.О. из чернозёмов Украины [8]. Стрептомицинустойчивый мутант *B. subtilis* ИМВ В-7023 St^r был получен методом спонтанного мутагенеза. Он способен расти в питательных средах, содержащих 1600 мкг/мл стрептомицина [10]. Бактерии культивировали в периодических условиях при 28°C в течении 24 часов на качалках (240 об/мин) в колбах Эрленмейера объёмом 750 мл, содержащих по 100 мл глюкозо-минеральной среды [13].

В качестве инокулюма использовали односуточную культуру бактерий. Исходное количество жизнеспособных бактерий в среде составляло $1 \cdot 10^6$ кл/мл. Их численность определяли по количеству колоний, которые выросли на твёрдой питательной среде после посева суспензии из серийных десятикратных разведений.

В качестве дисперсного материала в экспериментах использовали сапонит. Он является разновидностью бентонитовых глин [17]. Дисперсный материал вносили в питательную среду перед стерилизацией в концентрациях 0,5–20,0 г/л.

Электрофоретические исследования проводили на установке для микроэлектрофореза [2]. Измеряли скорость электрофореза 50 клеток и рассчитывали их ζ – потенциал.

Сканирующую электронную микроскопию образцов проводили на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6060 LA (Япония). Элементный состав минерала определяли с помощью сканирующего электронного микроскопа JEOL JSM 5510, оборудованного детектором фирмы Oxford Instruments (Япония).

Фосфаты в питательной среде определяли методом Фиске-Суббароу [11].

Результаты опытов обрабатывали статистически с помощью программы «Statistica 6.0».

Результаты и их обсуждение. Исследовано влияние дисперсного минерала сапонита на рост *B. subtilis*. Установлено, что его внесение в среду культивирования, содержащую 0,6 г/л PO_4^{3-} , существенно увеличивало рост этих бактерий *B. subtilis*. Так, при содержании в среде 0,5 г/л сапонита численность клеток по сравнению с контролем увеличивалась на 80,0 %. При повышении содержания дисперсного материала в среде его стимулирующее влияние на рост этих бактерий увеличивалось. Максимальный прирост клеток наблюдался при содержании 5,0 и 10,0 г/л сапонита. В этом случае количество бактерий в опытных вариантах было, соответственно, в 2,3 и 2,4 раза выше, чем в контроле, а концентрация фосфата в среде снижалась не более, чем в 2,7 раза (рис. 1). При внесении в среду 20,0 г/л дисперсного минерала наблюдалось снижение его стимулирующего влияния на рост бактерий (их численность в опытном варианте была выше контроля, но ниже, чем в других вариантах) (рис. 1).

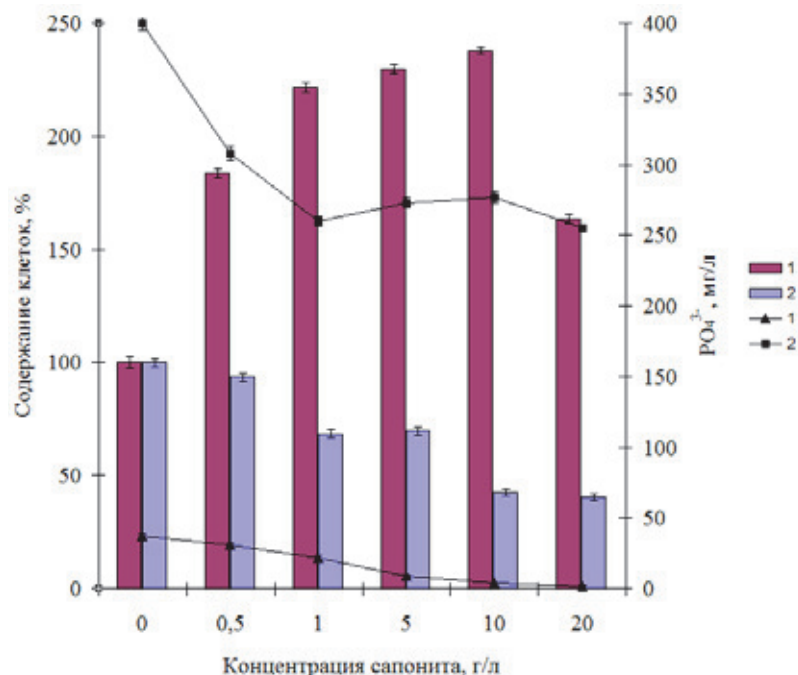


Рис. 1. Влияние сапонита на рост *B. subtilis* ИМВ В-7023 и остаточные концентрации фосфата в среде, содержащей 0,6 г/л (1) и 0,1 г/л (2) фосфата

Другую закономерность наблюдали при низком содержании PO_4^{3-} (0,1 г/л) в питательной среде. В таких условиях при внесении в среду дисперсных частиц сапонита во всех исследованных концентрациях имеет место снижение ростовой активности *B. subtilis* (рис. 1). Можно предположить, что данный эффект обусловлен лимитированием роста бацилл фосфатом в связи с взаимодействием данного компонента среды с катионами природного минерала. Возможность такого процесса была показана нами ранее [7]. Действительно, анализ остаточных концентраций фосфата в среде культивирования бацилл с 0,1 г/л PO_4^{3-} свидетельствует о том, что, несмотря на снижение прироста биомассы при повышении содержания сапонита, концентрация фосфата уменьшается. При содержании 20,0 г/л сапонита в среде концентрация фосфата была на уровне 2,0 мг/л после 24 часов культивирования, что, конечно же, лимитирует рост бактерий (рис. 1).

Взаимодействие микроорганизмов с твердыми материалами и, в конечном счете, метаболическая активность популяции в значительной степени определяется свойствами как твердого материала [5], так и поверхности бактериальной клетки [3]. Известно, что состав компонентов поверхности бактерий *B. subtilis* может существенно варьировать в зависимости от условий культивирования [15].

Известно, что исследуемые бактерии, выращенные в среде с 0,1 г/л PO_4^{3-} и 0,6 г/л PO_4^{3-} , отличаются свойствами поверхности [3]. Поэтому было целесообразно исследовать особенности взаимодействия клеток с сапонитом, полученных при этих условиях культивирования.

Вероятность взаимодействия микроорганизмов с твердыми материалами значительно увеличивается при содержании в дисперсной среде двух- и трёхвалентных катионов металлов [6]. Известно, что глинистые минералы характеризуются содержанием определенных минеральных компонентов и обладают катионообменными свойствами [17]. В связи с этим проведен элементный анализ сапонита. Установлено, что этот минерал содержит Mg - 6,25 %; Al - 6,80 %; Si - 20,08 %; K - 1,13 %; Ca - 0,84 %; Ti - 0,09 %; Fe - 7,34 %, что способствует взаимодействию бактерий с частицами глинистого минерала.

Ранее нами методом микроэлектрофореза была показана способность частиц дисперсного сапонита сорбироваться на поверхности клеток [13]. Методом электронной микроскопии было подтверждено контактное взаимодействие бактерий с частицами глинистого минерала с образованием агрегатов клеток (рис. 2).

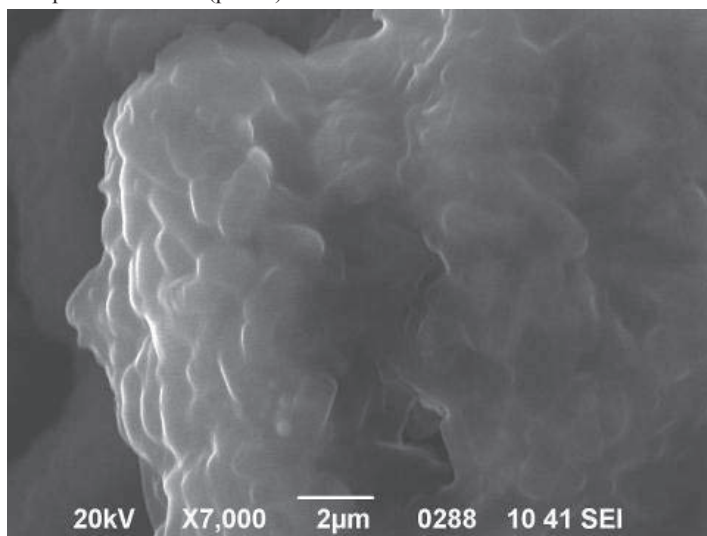


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия клеток *B. subtilis* ИМВ В-7023, выращенных в среде с 5,0 г/л сапонита

Таким образом, при культивировании *B. subtilis* при разных концентрациях фосфата в среде с сапонитом получены отличающиеся результаты (рис. 1). По-видимому, как раз, содержание фосфата является фактором, который определяет наличие или отсутствие эффекта стимулирующего влияния дисперсных материалов на рост бактерий. В то же время известно [3], что данный компонент среды является важным фактором, влияющим на соотношение тейхоевых и тейхуроновых кислот в составе клеточной стенки грамположительных бактерий. При снижении концентрации фосфата в среде блокируется синтез тейхоевых кислот (богатых фосфорными группами) и в поверхностном слое клеточной стенки возрастает количество тейхуроновых кислот [1].

Различия в составе поверхности бактерий могут быть определены методом микроэлектрофореза [16], что показано нами для исследуемого штамма *B. subtilis* [3]. В то же время тейхоевым кислотам отводится определенная роль в устойчивости грамположительных бактерий к антибиотикам [9]. Поэтому, можно было предположить, что в поверхностном слое клеток устойчивых, в частности, к стрептомицину *B. subtilis* ИМВ В-7023 St^r основным компонентом будут тейхоевые кислоты.

Полученные результаты (рис. 3) отображают изменение заряда поверхности клеток (ζ – потенциала) *B. subtilis* ИМВ В-7023 St^r в зависимости от pH дисперсионной среды. В отличие от результатов предыдущих исследований [3], полученных при культивировании родительского штамма в среде, содержащей разные концентрации фосфата, pH – зависимости ζ – потенциала стрептомицинустойчивого мутанта при таких условиях имеют идентичный характер. ζ – потенциал клеток достигал максимального значения при pH 3. Это свидетельствует о том, что электроповерхностные свойства бактерий определяются наличием в поверхностном слое, в основном, фосфорнокислых групп, характерных для тейхоевых кислот [16]. Таким образом, установлено, что клетки *B. subtilis* ИМВ В-7023 St^r, которые культивировали при разном со-

держании фосфата, имеют подобные свойства поверхности, характерные для родительского штамма, выращенного при концентрации в среде 0,6 г/л PO_4^{3-} [3]. Поэтому можно было ожидать и подобной ответной реакции бактерий при их культивировании в среде, содержащей дисперсные материалы.

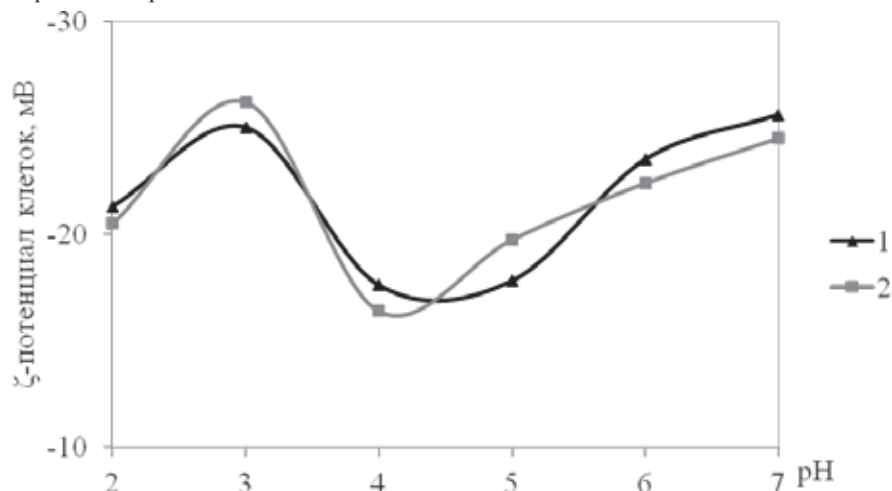


Рис. 3. ζ -потенциал клеток *B. subtilis* ИМВ В-7023 St^r, выращенных в среде с 0,6 г/л (1) и 0,1 г/л (2) фосфата, в зависимости от pH дисперсионной среды

Нами показано (рис. 4), что для *B. subtilis* ИМВ В-7023 St^r стимулирующее влияние сапонита на рост бактерий имеет место как при высокой, так и низкой концентрации фосфата в среде. Однако в данном случае необходимо отметить следующее: во-первых, явно выраженное стимулирующее влияние глинистого минерала имело место только при его содержании 1,0 г/л; во-вторых, численность бактерий была лишь на 20,0 – 30,0 % выше значений, чем в контрольном варианте.

Как указано выше (рис. 1), культивирование *B. subtilis* в среде, содержащей 0,1 г/л PO_4^{3-} и сапонит, сопровождалось снижением ростовой активности бактерий. В то же время у стрептомицинустойчивого мутанта при концентрации 0,1 г/л фосфата наблюдалось повышение ростовой активности в среде, содержащей до 1,0 г/л сапонита. При увеличении концентрации дисперсного материала в среде его стимулирующее влияние на рост этих бактерий уменьшалось (рис. 4). По-видимому, отсутствие лимитирования роста этого штамма в среде, содержащей 0,1 г/л PO_4^{3-} , может быть обусловлено тем, что на поверхности этих клеток имеются фосфорнокислые группы (рис. 3). По месту их локализации, по-видимому, могут растворяться адсорбированные на поверхности клеток труднорастворимые соединения, образуемые в среде при взаимодействии фосфата с компонентами сапонита.

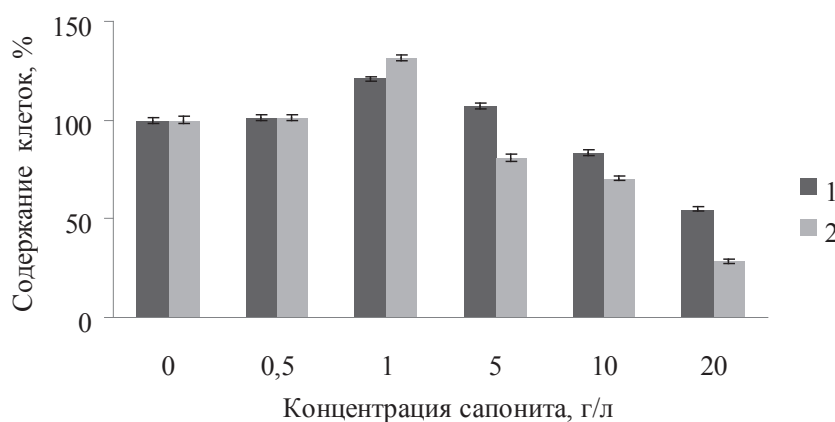


Рис. 4. Влияние сапонита на рост *B. subtilis* ИМВ В-7023 St^r в среде, содержащей 0,6 г/л (1) и 0,1 г/л (2) фосфата

Таким образом, проведенные исследования вносят определённый вклад в объяснение механизмов стимулирующего влияния дисперсных материалов на физиологическую активность микроорганизмов. Установлено, что при более высоких концентрациях фосфата в среде культивирования наблюдается стимулирующее влияние сапонита на рост *B. subtilis*, а при низких – ингибирование роста бактерий. Это коррелирует с различием типа поверхности бацилл, выращенных при 0,6 г/л и 0,1 г/л фосфата в среде.

А.Ю. Чоботарьов, А.С. Гордієнко, І.К. Курдиш

Институт мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ОСОБЛИВОСТИ РОСТУ *BACILLUS SUBTILIS* І СТРЕПТОМІЦИНСТІЙКОГО МУТАНТА В СЕРЕДОВИЩІ З САПОНІТОМ

Резюме

Досліджено вплив дисперсного сапоніту на ростоу активність *Bacillus subtilis* IMV B-7023 і його стрептоміцинстійкого мутанта. Ефективність даного процесу залежить як від вмісту дисперсного матеріалу, так і фосфату в середовищі. Встановлено, що при культивуванні *B. subtilis* в середовищі, що містить 0,6 г/л PO_4^{3-} , спостерігалася стимулювання росту бактерій цим мінералом, а при більш низьких концентраціях (0,1 г/л PO_4^{3-}) має місце зниження ростоу активності культури. У той же час для стрептоміцинстійкого мутанта показано збільшення ростоу активності в середовищі, яке містить до 1,0 г/л сапоніту, незалежно від концентрації фосфату. Показано, що даний ефект є наслідком однотипності властивостей поверхні стрептоміцинстійкого штаму бактерій і подібний батьківському штаму при концентрації 0,6 г/л PO_4^{3-} .

К л ю ч о в і с л о в а: *Bacillus subtilis*, стрептоміцинстійкий мутант, культивування, мікроелектрофорез, сапоніт.

A. Yu. Chebotarev, A. S. Gordienko, I. K. Kurdish

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

GROWTH PECULIARITIES OF *BACILLUS SUBTILIS* AND STREPTOMYCIN RESISTANT MUTANT IN THE MEDIUM WITH SAPONITE

S u m m a r y

The influence of dispersed saponite on growth activity of *Bacillus subtilis* IMV B-7023 and its streptomycin resistant mutant has been shown. The effectiveness of this process depends on the content of dispersed material and phosphate in the medium. It has been found that when *B. subtilis* is cultured in the medium containing 0.6 g/l PO_4^{3-} stimulation of bacteria growth is observed, but at a lower concentration (0.1 g/l PO_4^{3-}) there is a decline in the culture growth activity. At the same time streptomycin resistant mutant is shown to increase growth activity in the growth medium which contains up to 1.0 g/l saponite, regardless of the concentration of phosphate. It is shown that this effect is a consequence of uniformity of surface properties of streptomycin resistant strain of bacteria and similar parent strain at a concentration of 0.6 g/l PO_4^{3-} .

The paper is presented in Russian.

К е у w o r d s: *Bacillus subtilis*, streptomycin resistant mutant, cultivation, microelectrophoresis, saponite.

The authors address: Chebotarev A. Yu., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Вершинина О.А., Знаменская Л.В. Про регулоны бактерий // Микробиология. – 2002. – 71, № 1. – С. 581–595.
2. Глоба Л. И., Гордиенко А. С. Установка для микроэлектрофореза // Мед. Техника. – 1980. – № 2. – С. 50–51.
3. Гордиенко А.С., Курдиш И.К. Электроповерхностные свойства и взаимодействие с частицами диоксида кремния клеток *Bacillus subtilis* // Биофизика. – 2007. – 52, № 2. – С. 314–317.
4. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. – М.: Изд-во Моск. ун-та – 1987. – 246 с.