

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

INFLUENCE OF *PSEUDOMONAS AUREOFACIENS*  
OXYPOLYSACCHARIDES ON TUMOUR FORMATION  
CAUSED BY *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Summary

The ability of exopolysaccharides of *Pseudomonas aureofaciens* strains UKM B-111 and UKM B-306, components of insectofungicidal preparation Gaupsin, to influence the process of tumour formation caused by *Agrobacterium tumefaciens*. Bacterial polysaccharides, obtained on Kozer medium with glucose (possible alginates) blocked agrobacterium cell adhesion by 29-49 %. Those obtained on the medium with sucrose polysaccharides (possible levans) by 30-75 % inhibit later stages of tumour formation.

The paper is presented in Ukrainian.

**Key words:** exopolysaccharides of *Pseudomonas aureofaciens*, tumour formation, *Agrobacterium tumefaciens*.

**The author's address:** Balko O.I. Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Zabolotny St., Kyiv. MSP, D03143, Ukraine.

1. Гвоздяк Р.І., Пасічник Л.А., Ващенко Л.М. Вплив ліпополісахарид-білкового комплексу *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* на процес пухлиноутворення, спричинений *Agrobacterium tumefaciens* // Мікроб. журн. – 2003. – 65, № 3. – С. 5–13.
2. Коноп Л.А., Гайдай А.Е., Милкус Б.Н. Бактериальный рак винограда на Украине // Вісник Одеського національного університету – 2001. – 6, № 4. – С. 181–183.
3. Пат. 73682. Инсектофунгицидный биопрепарат для борьбы із шкідниками і хворобами сільськогосподарських культур / О.А. Кіпріанова, С.В. Гораль. – Опубл. 15.08.05, Бюл. № 8.
4. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В. Образование экзополисахаридов на углеводных субстратах штаммом *Acinetobacter* sp. и особенности его метаболизма // Микробиология. – 2002. – 72, № 2. – С. 215–221.
5. Сарнацкая В.В. Физиологические аспекты опухолевого роста растений. – Киев: Наук. думка, 1993. – С. 3–24.
6. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. – Киев: Наук. думка, 1990. – С. 58–61.
7. Hisham El-Masry N., Mostafa H. Mostafa, A. Mohamed Ibrahim, Manal M.A. El-Naggar marine algae that display anti-tumorigenic activity against *Agrobacterium tumefaciens* // FEMS Microbiol. Letters – 1995. – 128 – P. 151–156.
8. Morello J.E., Pierson E.A. and Pierson L.S. Negative cross-communication among wheat rhizosphere bacteria: effect on antibiotic production by the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30–84 // Appl. and Environ. Microbiol. – 2004. – 70, N 5. – P. 3103–3109.
9. Osman S.F., Fett W.F. and Fishman M.L. Exopolysaccharides of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* // J. of Bacteriol. – 1986. – 166, N 1. – P. 66–71.
10. Singh S., Fett W.F. Stimulation of exopolysaccharide production by fluorescent pseudomonads in sucrose media due to dehydration and increased osmolarity // FEMS Microbiol. Letters – 1995. – 130. – P. 301–306.

Отримано 10.02.2008

УДК 579.083.13

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

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

**ВЛИЯНИЕ ДИОКСИДА ТИТАНА НА РОСТ  
*AZOTOBACTER VINELANDII* ИМВ В – 7076**

Внесение в среду культивирования высокодисперсных частиц диоксида титана оказывает стимулирующее действие на рост *Azotobacter vinelandii* ИМВ В – 7076. Максимальный эффект наблюдается при концентрации данного материала 5 г/л и 10 г/л. В этих условиях количество выросших бактерий в несколько раз выше, чем в контрольных вариантах. Показано, что стимулирующий эффект не может быть следствием сорбции сахарозы на поверхности частиц дисперсного материала. Возможно, кон-

© А.С. Гордиенко, А.Ю. Чеботарев, И.К. Курдиш, 2009

тактное взаимодействие клеток бактерий с диоксидом титана обуславливает увеличение проницаемости клеточной стенки, что приводит к возрастанию степени поступления субстрата в клетку.

*Ключевые слова:* *Azotobacter vinelandii*, культивирование, диоксид титана.

Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями широко распространено в природе. На основании известных данных можно утверждать [16], что 99 % микроорганизмов в почве и водной среде функционируют в контакте с твердыми частицами. Внесение твердых адсорбентов различной природы и степени дисперсности в среду культивирования бактерий может изменять направленность физиологических и биохимических процессов, осуществляемых микроорганизмами и их ферментными системами, что во многих случаях приводит к увеличению скорости роста и размножения клеток, интенсивности наращивания биомассы [6, 7]. Для некоторых представителей рода *Azotobacter* также показано наличие стимулирующего влияния твердых частиц на физиологическую активность бактерий [9, 14]. Так, внесение в культуральную среду диоксида кремния или глинистого минерала палыгорскита приводит к существенному увеличению накопления биомассы микроорганизмов и возрастанию синтеза витаминов В<sub>1</sub> и В<sub>6</sub>, пиридоксина.

Контактное взаимодействие клеток с твердыми частицами приводит не только к изменению их физиологической активности. Установлено [10, 20], что в присутствии глинистых минералов возрастает эффективность хромосомной и плазмидной трансформации.

Ранее было предложено ряд моделей процесса, имеющего место при взаимодействии клеток микроорганизмов с твердыми поверхностями, в которых рассматриваются возможные факторы, обуславливающие стимулирующее действие контактного взаимодействия на физиологическую активность клеток [18]. Однако и до настоящего времени механизм данного явления неизвестен и находится на уровне предположений. В этих моделях определенная роль отводится свойствам поверхности твердых частиц, поэтому расширение спектра исследуемых дисперсных материалов является актуальным.

Одним из материалов, которые могут оказывать влияние на функционирование микроорганизмов, является титан и его соединения. Так, установлено [15], что поверхность титана является идеальной подложкой для микробной колонизации и образования мощной биопленки. Имобилизация бактерий в гель гидроксида титана может приводить как к снижению [11], так и к повышению их ферментативной активности [4].

Цель работы – исследование влияния диоксида титана на рост бактерий *Azotobacter vinelandii* ИМВ В – 7076.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служил штамм бактерий *Azotobacter vinelandii* ИМВ В – 7076 [13]. Бактерии выращивали на среде Эшби с сахарозой и среде Берка. Культивирование микроорганизмов осуществляли при 28 °С в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих 100 мл среды. Время культивирования определялось условиями опыта. В качестве инокулюма использовали суточную культуру бактерий. Исходная концентрация клеток составляла –  $5 \cdot 10^6$  кл/мл. Количество жизнеспособных клеток оценивали по численности выросших на твердой питательной среде колоний после посева суспензии из серийных десятикратных разведений.

Диоксид титана (размер частиц 0.1–1.0 мкм) в различных концентрациях вносили в колбы перед стерилизацией среды культивирования.

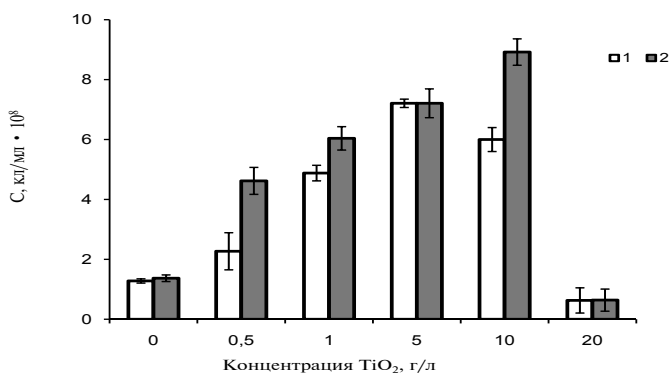
Электрофоретические исследования проводили на установке для микроэлектрофореза [1]. Выращенные клетки последовательно отмывали дважды в дистиллированной воде и один раз в соответствующем буферном растворе, в котором в дальнейшем изучали электроповерхностные свойства клеток. Растворы с постоянной ионной силой (0.05) получали смешиванием растворов NaCl и HCl (диапазон pH 2–4) либо использовали фосфатный буфер (pH 5–7). Измеряли скорость электрофореза 50 клеток и рассчитывали их  $\zeta$  – потенциал [5].

Концентрацию сахарозы определяли фенольно-серным методом [17].

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что внесение в среду культивирования диоксида титана оказывает существенное стимулирующее действие на рост бактерий *A. vinelandii* (рис. 1). Эффективность влияния данного материала возрастает с увеличением его концентрации как в среде Эшби, так и в среде Берка. Максимальный прирост клеток наблюдается при содержании диоксида титана 5 г/л и 10 г/л. В этом случае количество выросших бактерий в опытных вариантах более чем в пять раз выше, чем в контроле.

При концентрации в среде диоксида титана 20 г/л имеет место ингибирование роста культуры (численность бактерий в опытных вариантах была в несколько раз ниже, чем в контроле). Такой эффект при высоких концентрациях, например глинистых минералов, наблюдается для *Bacillus subtilis* [8]. Причина ингибирующего действия дисперсных материалов на рост микроорганизмов может заключаться в следующем. Известно [2], что при определенных концентрациях дисперсные материалы могут образовывать на поверхности клеток бактерий слой из сорбированных частиц. Вероятно, наличие такого слоя является фактором, ограничивающим поступление субстрата к поверхности клеток, что и обуславливает снижение ростовой активности микроорганизмов.

Таким образом установлено (рис. 1), что стимулирующее влияние диоксида титана на рост *A. vinelandii* имеет место при культивировании бактерий как на среде Эшби, так и на среде Берка. В то же время для бактерий *A. chroococcum* показано, что диоксид кремния способствовал более существенному приросту клеток на среде с мелассой, чем на среде Эшби [9]. Такое различие в стимулирующем влиянии дисперсного материала коррелирует с изменением свойств поверхности клеток, выращенных в средах различного состава [3]. Учитывая тот факт, что независимо от среды культивирования диоксид титана оказывает подобное влияние на рост *A. vinelandii*, представляло интерес изучить свойства поверхности клеток этих бактерий.



**Рис. 1.** Численность жизнеспособных клеток *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 (С) при выращивании бактерий в среде Эшби (1) и Берка (2), содержащих диоксид титана, после 48 ч. культивирования

Исследование электроповерхностных характеристик бактерий при разных значениях рН дисперсной среды позволяет в определенной степени судить о наличии тех или иных компонентов на клеточной поверхности [19]. На рис. 2 представлены рН–зависимости заряда поверхности ( $\zeta$  – потенциала) клеток *A. vinelandii*. Для бактерий, выращенных на среде Берка, имеет место снижение отрицательного заряда клеток при рН 3. Очевидно это связано с наличием в поверхностном слое незначительного количества аминогрупп, как это постулируется авторами [21], получившими аналогичные результаты для бактерий *S. epidermidis*. В то же время при рН > 3 бактерии *A. vinelandii*, выращенные как на среде Эшби, так и на среде Берка имеют подобный тип рН–зависимости  $\zeta$ -потенциала. Как было ранее обосновано [3], такой тип зависимости указывает на то, что поверхностный слой бактерий включает

кислые полисахариды, содержащие как фосфорнокислые, так и карбоксильные ионогенные группы. Таким образом, не выявлено существенных различий в свойствах поверхности клеток *A. vinelandii*, выращенных на разных средах, что коррелирует с результатами исследований влияния диоксида титана на рост данных бактерий.

Одним из возможных процессов, определяющих стимулирующее действие контактного взаимодействия микроорганизмов с твердыми поверхностями, может быть сорбция субстрата на частицах, что обуславливает возрастание доступности компонентов питания для клеток [18]. Однако нами показано, что при содержании в среде сахарозы 20 г/л, а диоксида титана 5 г/л (оптимальная концентрация в ростовых экспериментах) количество сорбированного субстрата на частицах дисперсного материала составляет 0,5 г/л, то есть не более 3 %.

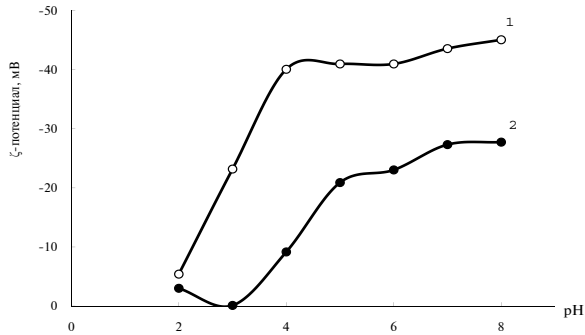


Рис. 2.  $\zeta$ -потенциал клеток *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076, выращенных на среде Эшби (1) и Берка (2) в зависимости от pH дисперсионной среды

Учитывая низкий уровень сорбции сахарозы на диоксиде титана, можно утверждать, что концентрация субстрата у поверхности клеток *A. vinelandii* в отсутствие и при наличии в среде дисперсных частиц одинакова в начале процесса культивирования бактерий. Следовательно, в соответствии с известными моделями роста микроорганизмов [12] должна наблюдаться адекватность в скорости накопления биомассы бактерий. Однако, как установлено (рис. 3), уже на ранней стадии роста культуры (12 ч) количество выросших клеток *A. vinelandii* в контрольном варианте составляло  $0,18 \cdot 10^8$  кл/мл, в то время как в опытном  $0,32 \cdot 10^8$  кл/мл. Таким образом, стимулирующее влияние диоксида титана проявляется даже при высоких концентрациях субстрата и имеет место на всех этапах развития культуры микроорганизмов.

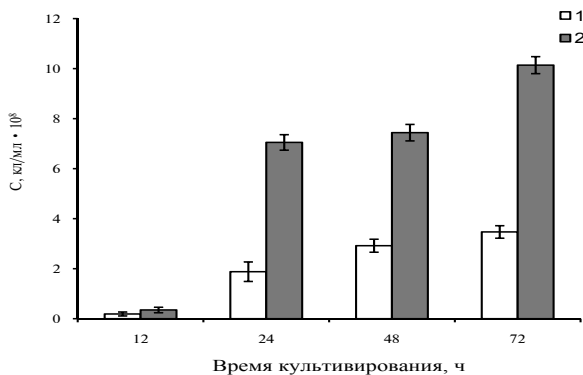
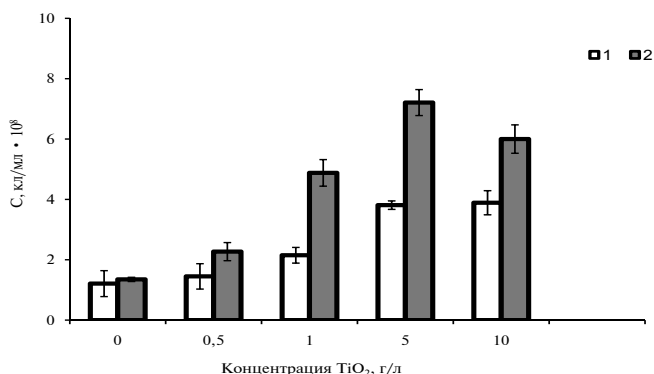


Рис. 3. Численность жизнеспособных клеток *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076, (C) в зависимости от времени культивирования бактерий в среде Эшби в отсутствие (1) и при наличии в среде 5 г/л диоксида титана (2)

Известные модели [12] предусматривают зависимость скорости роста микроорганизмов от концентрации субстрата в среде. Однако понятно, что скорость ферментативных реакций и процесс биосинтеза будет определяться концентрацией субстрата внутри клетки. Следовательно, определяющим фактором, влияющим на рост микроорганизмов, является интенсивность поступления субстрата в клетку. Таким образом, можно предположить, что контактное взаимодействие бактерий с высокодисперсными частицами диоксида титана приводит к возрастанию проницаемости клеточной стенки, то есть к «облегченной» диффузии субстрата во внутрь клетки, что должно обеспечивать как увеличение скорости роста культуры, так и более полное потребление субстрата.

Если «облегченная» диффузия имеет место, то тогда должна более явно проследиваться зависимость накопления биомассы микроорганизмов от концентрации субстрата в среде. На рис. 4 представлены данные исследования роста бактерий *A. vinelandii* при содержании в среде культивирования сахарозы 10 г/л и 20 г/л. В контрольном варианте не обнаружено существенного различия в ростовой активности бактерий, выращенных в данных условиях. В то же время, в присутствии частиц диоксида титана, увеличение концентрации сахарозы в среде культивирования приводит к существенному увеличению количества выросших клеток.



**Рис. 4.** Численность жизнеспособных клеток *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 (С) при выращивании бактерий в питательной среде Эшби, содержащей диоксид титана. Концентрация сахарозы: 10 г/л (1) и 20 г/л (2). Время культивирования – 48 ч.

Таким образом, установлено, что внесение в среду культивирования высокодисперсных частиц диоксида титана способствует возрастанию ростовой активности бактерий *A. vinelandii*. Показано, что данный эффект не является следствием сорбции сахарозы на поверхности частиц дисперсного материала. Возможно, контактное взаимодействие клеток бактерий с диоксидом титана обуславливает увеличение проницаемости клеточной стенки, что приводит к возрастанию степени поступления субстрата во внутрь клетки и, как следствие, более полному его потреблению.

*А. С. Гордіско, А. Ю. Чоботарьов, І. К. Курдиш*

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

**ВПЛИВ ДИОКСИДУ ТИТАНУ НА РІСТ  
*AZOTOBACTER VINELANDII* ИМВ В – 7076**

**Резюме**

Внесення у середовище культивування високодисперсних частинок диоксиду титану має стимулюючий вплив на ріст *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076. Максимальний ефект спостерігається при концентрації даного матеріалу 5 г/л і 10 г/л. У цих умовах кількість бактерій, що виростили, в декілька разів більша, ніж у контрольних варіантах.

Показано, що стимулюючий ефект не може бути результатом сорбції сахарози на поверхні часточок дисперсного матеріалу. Можливо контактна взаємодія клітин бактерій із діоксидом титану обумовлює збільшення проникності клітинної стінки, сприяє підвищенню ступеня надходження субстрату в клітину.

Ключові слова: *Azotobacter vinelandii*, культивування, діоксид титану.

*A.S. Gordienko, A.Yu. Chebotarjov, I.K. Kurdish*

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

INFLUENCE OF TITANIUM DIOXIDE ON GROWTH  
OF *AZOTOBACTER VINELANDII* IMV V-7076

S u m m a r y

Adding highly dispersed titanium dioxide particles of the culture medium has a stimulatory effect on growth of *Azotobacter vinelandii*. The maximum effect was observed when using 5 g/l and 10 g/l concentrations of this component. Under these conditions the number of grown bacteria is several times more than in the control variants. It was shown that the stimulatory effect could not be the consequence of saccharose sorption on the surface of particles of the dispersed compound. Possibly, the contact interaction of bacterial cell with titanium dioxide causes an increase of cell wall permeability which leads to an increase of substrates transport to the cell.

The paper is presented in Ukrainian.

К е y w o r d s: *Azotobacter vinelandii*, cultivation, titanium dioxide.

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

1. Глоба Л.И., Гордиенко А.С. Установка для микроэлектрофореза // Мед. техника, 1980. – № 2. – С. 50–51.
2. Глоба Л.И., Гордиенко А.С., Гарбара С.В., Ротмистров М.Н. Взаимодействие бактерий с природным черкасским палыгорскитом при различных значениях рН среды // Микробиол. журн. – 1983. – 45, № 2. – С. 22–26.
3. Гордиенко А.С., Титова Л.В., Курдиш И.К. Электрокинетические свойства азотфиксирующих бактерий. // Микробиол. журн. – 1996. – 58, № 2, – С. 22–28.
4. Гулевская С.А., Донова М.В., Коцеев К.А., Поморцева Н.В., Красильникова Т.Н. Структурно-функциональная характеристика свободных и иммобилизованных в гидроокиси титана клеток *Glucosporium oxudans* в процессе превращения D-сорбита в L-сорбозу // Прикл. биохим. и микробиология. – 1990. – 26, № 5. – С. 642–650.
5. Духин С.С., Дерягин Б.В. Электрофорез. – Москва: Наука, 1976. – 328 с.
6. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы – Москва: Изд-во МГУ, 1987. – 246 с.
7. Курдиш И.К. Гранулированные микробные препараты для растениеводства: наука и практика. КВІЦ – Киев, 2001. – 142 с.
8. Курдиш И.К., Бега З.Т. Влияние глинистых минералов на рост фосфатмобилизующих бактерий *Bacillus subtilis* // Прикл. биохим. и микробиол. – 2006. – 42, № 4. – С. 438–442.
9. Курдиш И.К., Титова Л.В., Цимберг Е.А. Влияние аэросилов на рост *Azotobacter chroococcum* // Микробиол. журн. – 1993. – 55, № 1. – С. 38–42.
10. Лотарева О.В., Прозоров А.А. Генетическая трансформация клеток *Bacillus subtilis* в присутствии частиц глинистых минералов монтмориллонита и коалинита // Микробиология. – 2000. – 69, № 5. – С. 681–685.
11. Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю., Демакова В.А. Иммобилизация бактерий, гидратирующих нитрилы // Міжнародна наукова конференція «Мікробні технології» (Одеса, верес. 2006 р.): Тез. доп. – Одеса: Астропринт, 2006. – С. 194.
12. Манаков М.Н., Победимский Д.Г. Теоретические основы технологии микробиологических производств – Москва: Агропромиздат, 1990. – 270 с.
13. Пат. 72856 України, Штам бактерій *Azotobacter vinelandii* для одержання бактеріального добрива для рослинництва / Курдиш І.К., Бега З.Т. Опубл. 15.08.2006. Бюл. №8.
14. Титова Л.В., Античук А.Ф., Курдиш И.К. и др. Влияние высокодисперсных материалов на физиологическую активность бактерий рода *Azotobacter* // Микробиол. журн. – 1994. – 56, № 3. – С. 60–65.
15. Brown I., Jones G.E.B. An investigation into microbial colonization of surface of titanium condenser tubes exposed to Thames river water // Int. Biodeterior. Bull. – 1982. – 18, № 3. – P. 67–79.
16. Costerton J.W., Marrie M.J., Cheng K.J. Phenomena of bacterial adhesion // Bacterial adhesion: Mechanism and physiological significance. – New York, London: Plenum press, 1985. – P. 3–43.

17. *Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., et al.* // Colorimetric method for deformation of sugars and related substances // *Anal. Chem.* – 1956. – **28**, N 3. – P. 350–356.
18. *Fletcher M.* Effect of solid surfaces on the activity of attached bacteria // *Bacterial adhesion.* – New York, London: Plenum press, 1985. – P. 339–326.
19. *James A.M.* The electrical properties and topochemistry of bacterial cells // *Adv. Colloid. and Interface Sci.* – 1982. – **15**, № 3–4. – P. 429–438.
20. *Lee G.H., Stotzky G.* Transformation and survival of donor, recipient and transformants of *Bacillus subtilis* in vitro and in soil. // *Soil. Biol. and Biochem.* – 1999. – **31**, № 11. – P. 1499–1508.
21. *Van der Mei H.C., Brokke P., Dankert J., Jan J.F., Rouxhet P.G. and Busscher H.J.* Physicochemical surface properties of nonencapsulated and encapsulated coagulase-negative staphylococci // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 1989. – **55**, N 11. – P. 2806–2814.

Отримано 25.01.2008