

## ХЕМОТАКСИС *BACILLUS SUBTILIS* К ОРГАНИЧЕСКИМ СОЕДИНЕНИЯМ

Получены новые данные о хемотаксисных свойствах, в том числе трофическом таксисе *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 к некоторым аминокислотам, углеводам и органическим кислотам. Хемотаксис данного штамма отличался от такового у изученного ранее представителя этого вида как по интенсивности, так и по типу реакции. Отмечено совпадение хемотаксисной реакции и трофического таксиса к большинству исследованных эффекторов. В то же время показано, что к аттрактантам инозиту и сорбиту трофический таксис отсутствовал. Серин и лимонная кислота проявляли либо репеллентные, либо аттрактантные свойства в зависимости от концентрации, а рамноза и дульцит были нейтральными эффекторами.

*Ключевые слова:* хемотаксис, трофический таксис, аттрактант, репеллент, *Bacillus subtilis*.

Хемотаксис – это поведенческий ответ подвижных клеток на химические вещества посредством движения по направлению к аттрактантам и от репеллентов [8]. В научной литературе освещены вопросы хемотаксисной реакции *Bacillus subtilis* на некоторые химические вещества [11, 13], изучались белки хемотаксиса у данных микроорганизмов [9, 15], проведено сравнение механизма их хемотаксиса с *Escherichia coli*, как наиболее исследованного объекта в этой области [14]. Для *Bacillus thuringiensis* были отмечены различия в хемотаксисе у диссоциативных форм внутри популяции [4].

В отделе микробиологических процессов на твёрдых поверхностях Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины из чернозёмной почвы Украины выделен штамм *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 [6]. Он используется в качестве компонента гранулированного бактериального препарата комплексного действия на растения. Известно, что хемотаксис играет одну из основных ролей на первичных этапах установления взаимоотношений между микробным и растительным организмом, поскольку бактерии реагируют на питательные вещества и сигнальные молекулы, содержащиеся в корневых экссудатах [1]. Следовательно, от хемотаксисной активности микроорганизма может зависеть эффективность использования препарата.

В связи с отсутствием сведений относительно хемотаксиса бацилл, выделенных из природных экониш Украины, целью работы было изучить хемотаксисные свойства у агрономически ценного штамма *B. subtilis* ИМВ В-7023.

**Материалы и методы.** Объектом исследования были фосфатмобилизующие бактерии *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 [6]. Их культивировали до середины фазы логарифмического роста на пептонной среде следующего состава (в г/л): пептон – 10.0, NaCl – 3.0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.3, KCl – 0.3,  $KH_2PO_4$  – 0.2,  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  и  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – следы, вода дистиллированная – до 1 л. pH среды 6.5. Затем бактерии отмывали от среды 3 раза калий-фосфатным буфером (0.01 М, pH 7.0) путём центрифугирования при 2000 г. В работе использовали суспензии либо полужидкие среды, которые содержали  $\sim 5 \times 10^8$  кл/мл. Все исследования проводили при температуре 28°C.

Трофический таксис исследовали в полужидкой среде [5], содержащей 0.35 % агара “Экстра”, калий-фосфатный буфер (0.01 М, pH 7.0) и эффекторы («Реахим», хч) в концентрации  $10^{-3}$ М. После нанесения на поверхность застывшей среды 20 мкл суспензии бактерий через 72 часа учитывали ширину зон их продвижения от края капли.

Изучение положительного и отрицательного хемотаксиса проводили также в полужидкой среде согласно методике, описанной в [4, 5]. При этом отмытые клетки бацилл ресуспендировали в минимальном количестве калий-фосфатного буфера (до 5 мл) и добавляли в расплавленную и охлажденную полужидкую среду, содержащую 0.25 % агара “Экстра” и буфер. Среду разливали в чашки Петри по 15 мл, в центр чашки помещали агаровые блоки радиусом 20 мм, содержащие буфер, 1.5 % агара и эффекторы в концентрации  $10^{-2}$ М. Через 18 часов измеряли ширину хемотаксисных колец и фотографировали их. В том случае, если исследу-

емые вещества были аттрактантами, вокруг дисков с ними наблюдали скопление бактерий в виде хемотаксисных колец. Наличие просветов, следовательно, движения микроорганизмов от дисков с эффекторами, свидетельствовало о репеллентных свойствах эффекторов.

В исследованиях использовали также капиллярный метод оценки хемотаксиса, где учитывали отношение количества клеток, зашедших в опытные капилляры с эффектором и контрольные с калий-фосфатным буфером [2]. Статистическую обработку полученных результатов проводили, используя метод вариационной статистики [3].

**Результаты и их обсуждение.** Как известно, микроорганизмы могут рецептировать большое количество химических веществ [8]. Однако, не все эти вещества, в том числе и у *B. subtilis*, используются в процессе клеточного метаболизма [13]. Направленное движение бактерий по отношению к метаболизируемым веществам принято определять понятием трофического хемотаксиса [5, 10]. Изучение трофического таксиса *B. subtilis* ИМВ В-7023 позволило выяснить, что большинство исследованных аминокислот были хемоаттрактантами (табл. 1). Трофический хемотаксис данные бактерии в максимальной степени проявили к аспарагиновой кислоте, аланину и изолейцину (табл. 1), в то время как для штамма *B. subtilis* O18, описанного Ordal & Goldman [12], наиболее сильными аттрактантами были метионин, серин и глутамин [11]. Следует отметить, что образование хемотаксисных колец при данном методе изучения хемотаксиса обусловлено потреблением эффекторов на близлежащем к нанесенной на поверхность капли бактерий участке полужидкой среды, в результате чего возникает градиент концентраций веществ, хемотаксисная реакция и продвижение бактерий к более богатым питательными веществами участкам. Показано, что интенсивность роста бактерий отличалась в хемотаксисных кольцах с различными эффекторами (табл. 1). Особо необходимо отметить варианты, в которых при незначительной зоне распространения бактерий наблюдали рост большой интенсивности. Это характерно, например, для глутаминовой кислоты, треонина. Имели место также варианты с большими хемотаксисными кольцами, но ростом в них меньшей интенсивности (изолейцин). Такие факты можно объяснить различиями в скорости потребления данных субстратов микроорганизмами.

Таблица 1

Трофический таксис *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 к аминокислотам

Вариант	Ширина хемотаксисных колец, мм	Интенсивность роста в кольце
Контроль (без эффектора)	1.8±0.3	+
D-α-аланин	8.5±0.0	+++
L-аргинингидрохлорид	6.7±0.2	+++
DL-аспарагиновая кислота	9.0±0.4	+++
DL-валин	6.3±0.3	+
L-гистидингидрохлорид	5.2±0.5	+++
Глицин	4.0±0.0	+
L-глутаминовая кислота	3.8±0.4	+++
L-изолейцин	8.3±0.4	++
DL-лейцин	5.7±0.3	++
DL-метионин	6.9±0.4	++
DL-серин	0.0±0.0	–
DL-тирозин	4.6±0.2	++
DL-треонин	5.7±0.2	+++
DL-β-фенилаланин	5.7±0.4	++
L-цистеин	7.6±0.6	++

**Примечание:** “+++” сильная, “++” средняя, “+” слабая интенсивность роста бактерий в хемотаксисном кольце, “–” рост отсутствует.

*B. subtilis* ИМВ В-7023 проявили интенсивный трофический таксис к некоторым углеводам (арабиноза, глюкоза, сахароза, маннит) и органическим кислотам (янтарная, лимонная) (табл. 2). Все эти вещества широко распространены в природе в составе плодов, проросших зёрен, а также экссудатов. Хемотаксис данных бактерий к салициловой кислоте, которая является эндогенным регулятором роста растений и индуцирует их приобретённую устойчивость к разнообразным по природе стрессам [7], был менее значительным.

В то же время при изучении трофического таксиса было обнаружено, что в полужидкой среде с серином хемотаксисные кольца не образовывались (табл. 1), а в средах с рамнозой,

дульцитом, инозитом и сорбитом ширина хемотаксисных колец была на уровне контрольного варианта без эффекторов (табл. 2).

Исследование положительного и отрицательного хемотаксиса к некоторым веществам, использованным в экспериментах по определению трофического таксиса, показало, что значительное большинство из них являются аттрактантами (табл. 3). Исключение составили серин, который в количестве  $10^{-2}$ М проявил репеллентные свойства, а также рамноза и дульцит, показавшие себя нейтральными эффекторами. Инозит и сорбит, к которым трофического таксиса не наблюдали, оказались аттрактантами (табл. 3).

Таблица 2





**Трофический таксис *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023  
к некоторым углеводам и органическим кислотам**

Вариант	Ширина хемотаксисных колец, мм	Интенсивность роста в кольце
Контроль (без эффектора)	2.0±0.6	+
L(+)-арабиноза	9.7±0.5	++
D-глюкоза	8.0±0.0	+++
D(+)-мальтоза	7.3±0.6	+++
L(+)-рамноза	1.8±0.3	+
Сахароза	10.7±0.5	+++
Дульцит	2.0±0.2	+
i-инозит	1.9±0.4	+
D(-)-маннит	11.0±0.8	+++
D(+)-сорбит	2.2±0.1	+
Лимонная кислота	6.8±0.3	+++
Салициловая кислота	5.0±0.0	+
Янтарная кислота	7.2±0.3	+++


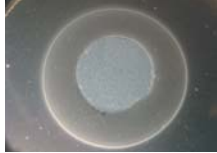








**Примечание:** “+++” сильная, “++” средняя, “+” слабая интенсивность роста бактерий в хемотаксисном кольце.

Таблица 3

**Хемотаксис *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023  
к некоторым углеводам и органическим кислотам**

Вариант	Фото хемотаксисных колец	Ширина хемотаксисных колец, мм	Эффекторные свойства веществ
1	2	3	4
Контроль (без эффектора)		0.0	кольца нет
L(+)-арабиноза		8.0	аттрактант
D-глюкоза		6.0	аттрактант
D(+)-мальтоза		8.0	аттрактант

Продолжение табл. 3

1	2	3	4
L(+)-рамноза		0.0	нейтральный эффект
Сахароза		9.0	аттрактант
Дульцит		0.0	нейтральный эффект
i-инозит		8.0	аттрактант
D(-)-маннит		7.0-8.0	аттрактант
D(+)-сорбит		7.0-7.5	аттрактант
Лимонная кислота		5.0	репеллент
Салициловая кислота		5.0	аттрактант
Янтарная кислота		5.0-6.0	аттрактант
Серин		9.0	репеллент

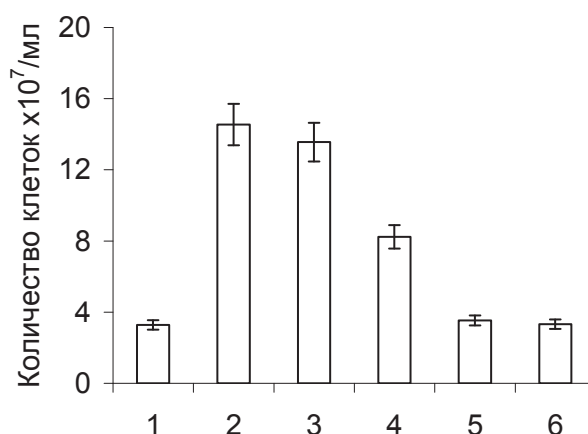
Примечание: ширина хемотаксисных колец была одинаковой в 4-х повторностях эксперимента.

Лимонная кислота в концентрации  $10^{-2}$ М проявила себя как репеллент (табл. 3), хотя при исследовании трофического таксиса, где её исходное содержание в хемотаксисной среде было  $10^{-3}$ М, являлась аттрактантом (табл. 2).

Для уточнения эффекторных свойств ряда веществ был применён капиллярный метод. Было подтверждено, что в концентрации  $10^{-2}$ М инозит и сорбит являлись аттрактантами для *B. subtilis* ИМВ В-7023, а рамноза и дульцит проявляли себя как нейтральные эффекторы (рис. 1). Для глюкозы была определена пороговая концентрация, которая составила  $10^{-6}$ М (рис. 2). Подобно исследованному в данной работе штамму, *B. subtilis* O18 проявил сильный хемотаксис к мальтозе, сахарозе, глюкозе, манниту и сорбиту [13]. В то же время арабиноза, являясь сильным аттрактантом для *B. subtilis* ИМВ В-7023 (табл. 2, 3), была для них слабым эффектором [13].

Эффекторные свойства серина зависели от его концентрации (рис. 2). Так, в капилляры с  $10^{-2}$ М серина заходило на 50 % меньше клеток бактерий, чем в контрольные капилляры с буфером, что свидетельствует о его репеллентных свойствах. В концентрации  $10^{-4}$ М серин был аттрактантом, а при дальнейшем снижении концентрации его аттрактантные свойства ослабевали. По хемотаксису к серину *B. subtilis* ИМВ В-7023 отличался от изученного ранее *B. subtilis* O18, для которого данное вещество было аттрактантом в концентрации от  $10^{-7}$  до  $10^{-1}$ М [11].

Таким образом, исследован хемотаксис *B. subtilis* ИМВ В-7023 к некоторым органическим соединениям. Для этого было применено три методических подхода, один из которых позволяет сравнительно быстро и одновременно определить в полужидком агаре положительный либо отрицательный хемотаксис бактерий по отношению к широкому кругу веществ, второй – изучить трофический таксис микроорганизмов, а капиллярный метод, являющийся относительно трудоёмким, может служить для более детального уточнения эффекторных свойств веществ. Показано, что штамм *B. subtilis* ИМВ В-7023 характеризовался несколько иными хемотаксисными свойствами по сравнению с изученным ранее Ordal et al. представителем данного вида *B. subtilis* O18 [11,13]. Так, хемотаксис к некоторым химическим веществам у *B. subtilis* ИМВ В-7023 отличался по интенсивности (наиболее сильными аттрактантами были другие аминокислоты либо углеводы, серин в концентрации  $10^{-2}$ М выступил репеллентом). В то же время выявлено совпадение хемотаксисной реакции и трофического таксиса *B. subtilis* ИМВ В-7023 к большинству протестированных эффекторов. Исключение составили инозит и сорбит, которые были аттрактантами, но трофический таксис к ним отсутствовал. Следовательно, для представителей вида *B. subtilis*, выделенных из разных регионов, свойственны межштаммовые различия в хемотаксисных свойствах, которые, по-видимому, обусловлены особенностями их функционирования в определённых условиях окружающей среды.



**Рис. 1.** Хемотаксис *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 к некоторым углеводам при исследовании капиллярным методом. Количество клеток в капиллярах с калий-фосфатным буфером (1) и с  $10^{-2}$ М глюкозы (2), инозита (3), сорбита (4), дульцита (5), рамнозы (6).

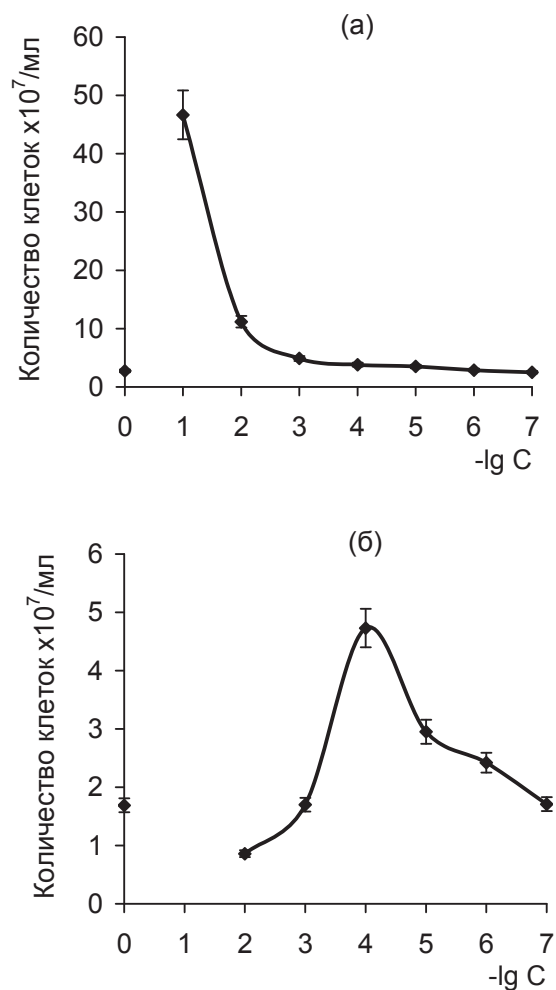


Рис. 2. Зависимость хемотаксиса *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 от концентрации глюкозы (а) и серина (б). С – концентрация веществ, моль. Точкой на оси ординат обозначено количество клеток в капиллярах с калий-фосфатным буфером.

Н. В. Чуйко

Институт мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, вул. Заболотного, 154, Київ  
МСП, Д03680, Україна

### ХЕМОТАКСИС *BACILLUS SUBTILIS* ДО ОРГАНІЧНИХ РЕЧОВИН

#### Резюме

Отримано нові дані про хемотаксисні властивості, включно про трофічний таксис *Bacillus subtilis* IMB B-7023 до деяких амінокислот, вуглеводів та органічних кислот. Хемотаксис даного штаму відрізнявся від такого у вивченого раніше представника цього виду як за інтенсивністю, так і за типом реакції. Відмічено збіг хемотаксисної реакції та трофічного таксису до більшості досліджених ефекторів. У той же час показано, що до атрактантів інозиту та сорбіту трофічний таксис був відсутнім. Серин та лимонна кислота проявляли чи репелентні, чи атрактантні властивості залежно від концентрації, а рамноза і дульцит були нейтральними ефекторами.

Ключові слова: хемотаксис, трофічний таксис, атрактант, репелент, *Bacillus subtilis*.

*N.V.Chuiko*

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

## CHEMOTAXIS OF *BACILLUS SUBTILIS* TOWARD ORGANIC COMPOUNDS

### S u m m a r y

New data about chemotaxis properties, including trophic taxis of *Bacillus subtilis* IMV B-7023 toward some amino acids, carbohydrates and organic acids was described. The chemotaxis of this strain differed from one of the studied before *Bacillus subtilis* both by intensity and by the type of reaction. The chemotaxis reaction and trophic taxis to majority of investigated effectors were compared. The trophic taxis to attractants of inositol and sorbitol were absent. Serine and citric acid were either repellents or attractants, depending on the concentration, and rhamnose and dulcitol were neutral effectors.

The paper is presented in Russian.

**K e y w o r d s:** chemotaxis, trophic taxis, attractant, repellent, *Bacillus subtilis*.

**T h e a u t h o r ' s a d d r e s s:** *Chuiko N.V.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine

1. *Кацы Е.И.* Молекулярная генетика ассоциативного взаимодействия бактерий и растений: состояние и перспективы исследований.– М.: Наука, 2007.– 123 с.
2. *Курдиш И.К., Антонюк Т.С., Чуйко Н.В.* Влияние некоторых факторов внешней среды на хемотаксис *Bradyrhizobium japonicum* // Микробиология. – 2001.– **70**, № 2.– С. 106–110.
3. *Лакин Г.Ф.* Биометрия.– М.: Высш. шк., 1990.– 352 с.
4. *Лебенко Е.В., Секерина О.А., Чемерилова В.И.* Особенности хемотаксиса у диссоциативных S- и R-вариантов *Bacillus thuringiensis* // Микробиология.– 2005.– **74**, № 1.– С. 87–91.
5. Методы изучения бактериальной подвижности в приложении к биохимическим, генетическим и иммунохимическим задачам / Сост.: А.В. Шелудько, Е.И. Кацы, Л.Ю. Матора и др./ Под. ред. В.В. Игнатова: Учеб.-метод. пособ. – Саратов: Научная книга, 2007.– 56 с.
6. Патент Украины №54923А. Штам бактерий *Bacillus subtilis* для одержання добрива для рослинництва / Курдиш І.К., Рой А.О. – Опубл. 17.03.2003, Бюл. №3.
7. *Шакирова Ф.М.* Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и её регуляция.– Уфа: Гилем, 2001.– 160 с.
8. *Adler J.* Chemotaxis in bacteria // Science.– 1966.– **153**, № 3737.– P. 708–716.
9. *Garrity L.F., Ordal G.W.* Activation of the CheA kinase by asparagine in *Bacillus subtilis* chemotaxis // Microbiology.– 1997.– **143**, Pt. 9.– P. 2945–2651.
10. *Levy A.* Modelling rhizosphere interaction of Burkholderia species: Thesis...Ph.D.– The University of Western Australia, 2007.– P. 180.
11. *Ordal G.W., Gibson K.J.* Chemotaxis toward amino acids by *Bacillus subtilis* // J. of Bacteriology.– 1977.– **129**, № 1.– P. 151–155.
12. *Ordal G.W., Goldman D.J.* Chemotaxis away from uncouplers of oxidative phosphorylation by *Bacillus subtilis* // Science.– 1975.– **189**, № 4237.– P. 802–805.
13. *Ordal G.W., Villana D.P., Rosendahl M.S.* Chemotaxis toward sugars by *Bacillus subtilis* // J. of General Microbiology.– 1979.– **115**.– P. 167–172.
14. *Rao V.R., Kirby J.R., Arkin A.P.* Design and diversity in bacterial chemotaxis: a comparative study in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* // PLOS Biology.– 2004.– **2**, № 2.– P. 0239–0252.
15. *Saulmon M.M., Karatan E., Ordal G.W.* Effect of loss of CheC and other adaptational proteins on chemotactic behaviour in *Bacillus subtilis* // Microbiology.– 2004.– **150**.– P. 581–589.

Отримано 16.11.2010