

УДК 579.22:579.243.6:631.461.61

ПРОДУКТИВНІСТЬ СИНТЕЗУ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДУ *BACILLUS MUCILAGINOSUS* ЗАЛЕЖНО ВІД ДЖЕРЕЛА АЗОТУ І ПОХОДЖЕННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ

І. М. Малиновська

Національний науковий центр «Інститут землеробства НААН»
вул. Машинобудівників 2Б, с. м. т. Чабани, Києво-Святошинський р-н, Київська обл., 08162, Україна;
e-mail: irina.malinovskaya.1960@mail.ru

Встановлено, що *Bacillus mucilaginosus* С-3 потребує внесення у середовище культивування джерела азоту в нітратній формі, за якої накопичується найбільша кількість біомаси і проходить процес споруляції, чого не забезпечує амонійна форма азоту. Інтенсивність використання азоту *B. mucilaginosus* залежить від фізіологічного стану клітин посівного матеріалу: при засіванні спорового посівного матеріалу оптимальна концентрація нітрату калію складає 2,5 г/л і накопичується 10^{10} кл./мл, при засіванні середовища вегетативними клітинами оптимальна концентрація нітрату калію складає 1,0 г/л і накопичується 10^9 кл./мл. Концентрація нітрату калію 2,5 г/л забезпечує максимальне накопичення як біомаси, так і позаклітинного полісахариду *B. mucilaginosus*.

За використання спорового посівного матеріалу спостерігається найвища продуктивність синтезу позаклітинного полісахариду. Зі збільшенням кількості пересівів *B. mucilaginosus* у вегетативному стані здатність до синтезу екзополісахариду істотно зменшується: за другого пересіву — на 20,0 %, за четвертого — на 56,5 %, за шостого — на 127,8 %. Після 8–9 пересівів культура втрачає здатність синтезувати полісахарид, особливо на середовищі зі співвідношенням $N : C = 1 : 3$, і поновлює цю здатність лише після проходження процесу споруляції або значного підвищення співвідношення $N : C$.

Ключові слова: *Bacillus mucilaginosus*, позаклітинний полісахарид, джерело азоту, посівний матеріал, спори.

Позаклітинний полісахарид *Bacillus mucilaginosus* має широкі перспективи використання на практиці: у медицині (імуностимулююча, імуномодулююча, протівірусна, протипухлинна активність) і ветеринарії (кормова добавка в раціон сільськогосподарських тварин, консервування кормів), у нафтодобувній і гірничій промисловості, у виробництві кераміки і змащувальних матеріалів, замінників відомих технічних масел, антифрікційної присадки у гальмівних та охолоджуючих розчинах [1–3]. Проте роботи, які присвячені дослідженню закономірностей росту і синтезу позаклітинного полісахариду *B. mucilaginosus*, мають суперечливий характер [4–7]. Так, за даними В. Г. Александрова і В. С. Подгорського зі співавт. [5; 6], можливий ріст культури на безазотних середовищах. Більшість вчених відстоює не-

обхідність внесення азоту у склад живильного середовища [4; 7]. Найбільш глибоке дослідження було проведене К. І. Сурман [7]. Вона показала, що *B. mucilaginosus* належить до олігонітрофілів і потребує для свого розвитку невеликих кількостей азоту в амонійній формі (0,03 % NH_4NO_3). Протиріччя між дослідниками існують не тільки щодо необхідності внесення азоту у середовище культивування, але й щодо його форми. Так, В. Г. Александров і Г. А. Зак [6] вважають, що органічні форми азоту інгібують ріст бактерій. Інші дослідники стверджують, що пептон (0,05 %) і дріжджова вода (2,0 %) стимулюють ріст і спорування *B. mucilaginosus* [1; 2].

Суперечливість отриманих даних, можливо, пов'язана з проведенням експериментів із різними штамми *B. mucilaginosus*, або

сумішшю варіантів, які відрізняються фізіолого-біохімічними властивостями. Тому існує необхідність подовження досліджень у напрямку вивчення фізіолого-біохімічних особливостей окремих штамів *B. mucilaginosus*.

Матеріали й методи. Предметом дослідження був штам *B. mucilaginosus* С-3, отриманий із колекції Інституту мінеральних ресурсів Міністерства геології України, куди його в 1963 році передав В. Г. Александров. Для культивування бактерій використовували середовище А-27, г/л: сахароза — 5,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 2,0; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,05; алюмосилікат калію — 1,0; крейда, розтерта з 0,1 г силікату — 1,0; рН 7,2 [6]. Для культивування бактерій використовували також мінеральне середовище А такого складу (г/л): глюкоза — 15,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,7; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 2,0; KNO_3 — 1,0; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,05. Склад середовища варіював залежно від умов і мети досліджень. Різні співвідношення N : C в середовищі створювали шляхом підвищення концентрації глюкози. Для отримання культури *B. mucilaginosus*, яка не синтезує екзополісахарид (ЕПС), її 3–5 разів пасажували у рідкому середовищі зі співвідношенням N : C = 1 : 3.

Вирощування *B. mucilaginosus* проводили у періодичному процесі, який здійснювали у колбах об'ємом 750 мл зі 100 мл середовища на качалці при 240 об./хв. Температура середовища культивування складала 30 °С, час культивування — 24 год. Об'єм посівного матеріалу складав 5 % від об'єму середовища. При вивченні впливу походження посівного матеріалу на синтез полісахариду концентрацію клітин і спор у середовищі визначали за допомогою камери Горяєва, при цьому концентрація спор після додавання посівного матеріалу у середовище складала $6,5 \cdot 10^7$ од./мл, концентрація вегетативних клітин — $7,0\text{--}7,4 \cdot 10^7$ кл./мл. Посівний матеріал на основі спор попередньо прогрівали за температури 80 °С впродовж 10 хв. для загибелі вегетативних клітин.

Вміст клітин, які синтезують екзополісахарид, визначали ваговим методом. Клітини осаджували при 40 000 г впродовж 40 хв. Бюкси з біомасою висушували до постійної маси за температури 105 °С. Для врахування

кількості клітин в культуральній рідині застосовували також метод прямого підрахунку в камері Горяєва та метод граничних розведень з подальшим висівом бактеріальної суспензії на агаризоване середовище.

Кількість позаклітинного полісахариду визначали ваговим методом з попереднім осадженням трьохкратним об'ємом етанолу. Для цього культуральну рідину (18–24 год.) розводили у 2–3 рази фізіологічним розчином, центрифугували для осадження клітин при 40 000 г впродовж 40 хв. Супернатант зливали і трьома об'ємами етанолу осаджували із нього полісахарид. Осаджений ЕПС відділяли від спирту центрифугуванням при 6000 об./хв. упродовж 10 хв. Етанольний осад розчиняли в дистильованій воді та діалізували проти питної води одну добу, проти дистильованої — дві доби. Висушування полісахариду проводили ліофільно.

Результати та їх обговорення. В результаті проведених досліджень встановлено, що ріст *B. mucilaginosus* на агаризованому середовищі А-27, яке запропонував В. Г. Александров, без додаткового внесення джерела азоту відбувається достатньо активно і закінчується до 72 годин культивування. Проте це не свідчить, як вважає В. Г. Александров [6], про можливість розвитку *B. mucilaginosus* за відсутності азоту. Загальновідомо, що на агаризованих середовищах джерелом азоту може слугувати агар-агар, який є продуктом переробки рослинної маси ламінарії, що містить достатню кількість азоту. При цьому, В. Г. Александров не дає чіткого визначення поняття «ріст». Він вважає, що ріст — це збільшення загальної слизистої біомаси без підрахунку саме кількості бактеріальних клітин. Тоді як відомо, що мікроорганізми за відсутності або нестачі азоту можуть синтезувати тільки вторинні метаболіти, зокрема, полісахариди, не збільшуючи чисельність клітин. Отже, твердження про ріст *B. mucilaginosus* на безазотних середовищах виникло внаслідок вибору неточного критерію росту і недостатньо чітких уявлень дослідників про фізіологію полісахаридсинтезуювальних мікроорганізмів.

До того ж, ріст мікроорганізму на агаризованому середовищі А-27 не супроводжується споруляцією. Внесення 0,1 % калій нітрату до агаризованого середовища призводить до масової споруляції культури впро-

довж трьох діб.

Вивчення росту *B. mucilaginosus* на живильних середовищах, які містять білкові речовини (МПА, МПБ, молоко), дозволило дійти висновку, що органічні форми азоту інгібують ріст цих бацил. Це співпадає з даними, які раніше опубліковані низкою авторів [6; 8].

Додавання у середовище культивування *B. mucilaginosus* азоту у мінеральній формі дозволило отримати значний приріст біомаси (рис. 1).

Оптимальною формою азоту виявилася нітратна форма. Зокрема, за внесення оптимальної концентрації нітрату калію (1,0 г/л) накопичується $20 \cdot 10^9$ кл./мл, а за внесення оптимальної концентрації сульфату амонію (0,5 г/л) — лише $40 \cdot 10^8$ кл./мл. Концентрація сульфату амонію 1,0 г/л виявилася інгібуючою для росту цього мікроорганізму. Ці дані не співпадають з результатами З. А. Авакян зі співавт. та К. І. Сурман [4; 7], згідно яких оптимальною формою азоту для *B. mucilaginosus* є амонійна, при цьому треба відмітити, що авторами досліджувалася лише ця форма азоту і порівняння з нітратною формою азоту не проводилось.

За внесення посівного матеріалу, який складається з вегетативних клітин, оптимальною для росту бактерій є концентрація

KNO_3 1,0 г/л. Кількість біомаси, яка накопичується за цієї концентрації джерела азоту, перевищує кількість посівного матеріалу у 20 разів (див. рис. 1). За використання посівного матеріалу у вигляді спор максимальна кількість біомаси утворюється за концентрації KNO_3 2,5 г/л і у 10,2 рази перевищує кількість біомаси, яка утворилася при тій самій концентрації KNO_3 за використання посівного матеріалу із вегетативних клітин. Отже, ефективність використання азоту культурою *B. mucilaginosus* залежить від фізіологічного стану клітин посівного матеріалу.

Оскільки важливим біотехнологічним продуктом *B. mucilaginosus* є його позаклітинний полісахарид, то необхідно було визначити оптимальну концентрацію нітрату калію не тільки для росту клітин продуценту, але й для накопичення полісахариду. Як видно із даних, представлених на рис. 2, максимальна концентрація позаклітинного полісахариду (3,62 г/л) визначається у середовищі за концентрації KNO_3 2,5 г/л. Подальше збільшення вмісту джерела азоту у середовищі не супроводжується зростанням концентрації екзополісахариду *B. mucilaginosus*. Таким чином, вміст у середовищі А нітрату калію 2,5 г/л забезпечує максимальне накопичення як біомаси, так і позаклітинного полісахариду *B. mucilaginosus*.

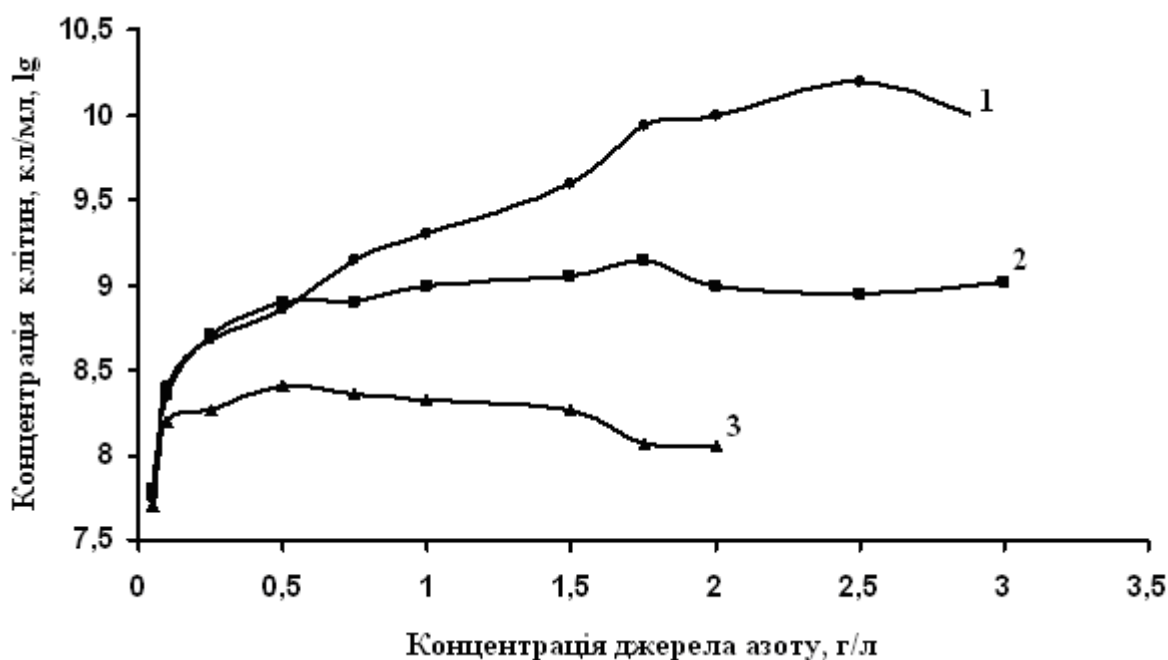


Рис. 1. Приріст біомаси *B. mucilaginosus* C-3 залежно від виду посівного матеріалу, форми і кількості джерела азоту.

Примітка: 1 — KNO_3 , посівний матеріал — спори; 2 — KNO_3 , посівний матеріал — вегетативні клітини; 3 — $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, посівний матеріал — вегетативні клітини.

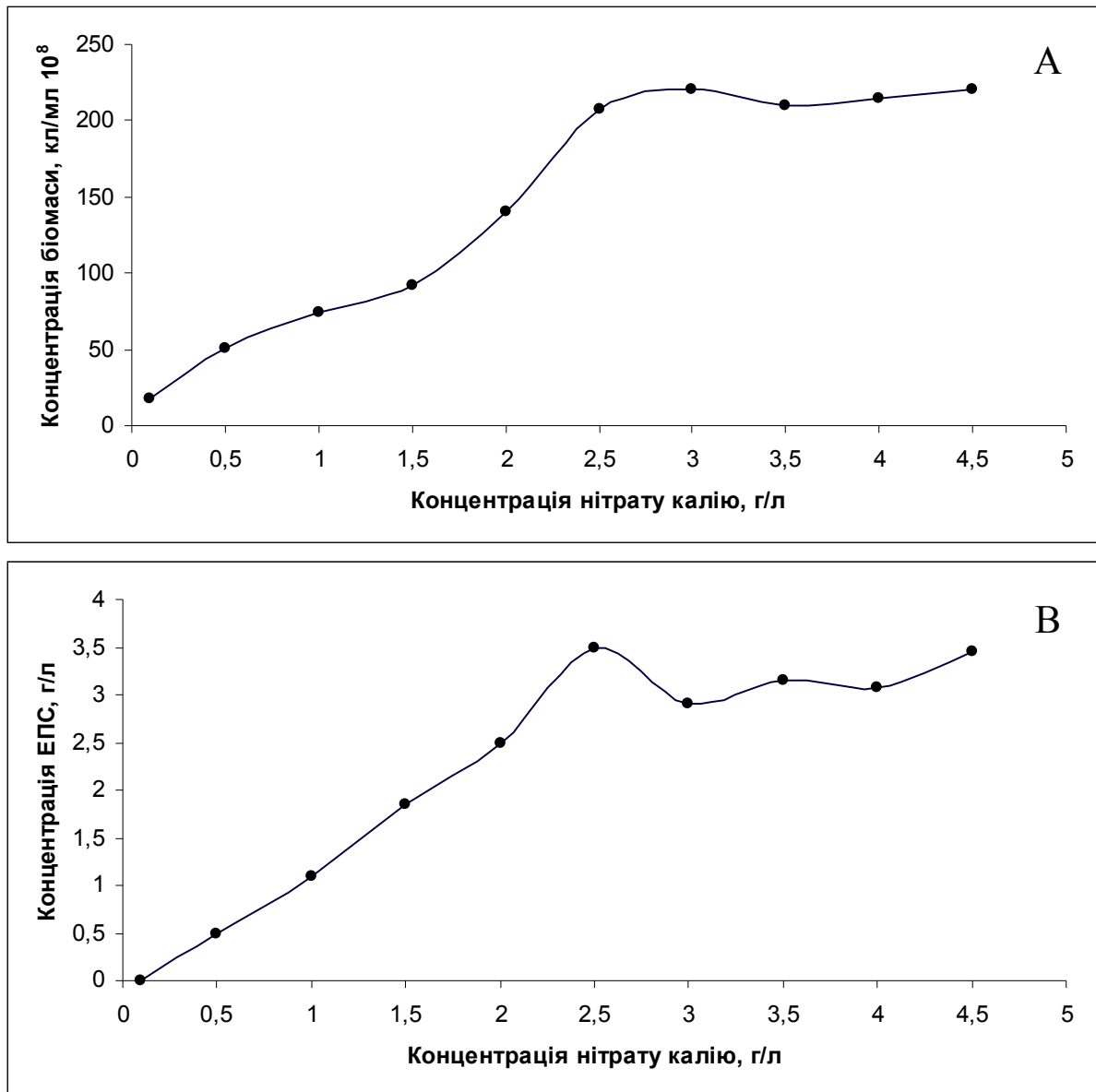


Рис. 2. Вплив концентрації джерела азоту на накопичення біомаси (А) і позаклітинного полісахариду (В) *B. mucilaginosus* C-3.

Відмінності метаболічних властивостей клітин продуценту, які виростили зі спор і вегетативних клітин, виявляються не лише в ефективності використання джерела азоту, а також у їхній здатності до синтезу позаклітинного полісахариду. Із збільшенням кількості пересівів вегетативних клітин у рідкому середовищі А здатність до синтезу екзополісахариду суттєво зменшується (рис. 3). Так, для спорового посівного матеріалу оптимальною для синтезу полісахариду концентрацією KNO_3 є 2,5 г/л, при якій синтезується 3,62 г/л полісахариду. При засіванні середовища культурою, яка пересівалася у рідкому середовищі двічі, оптимальна концентрація нітрату калію залишається на тому самому рівні, проте полісахариду синтезується на 20 % менше. За використання куль-

тури четвертого пересіву оптимальна концентрація нітрату калію зменшується до 2,25 г/л, при цьому синтезується 2,41 г/л полісахариду. При проведенні шести пересівів культури у вегетативному стані ще менш ефективно використовується джерело азоту і синтезується лише 1,65 г/л полісахариду. За концентрації KNO_3 5,5 г/л настає інгібування синтезувальних процесів. Наші дослідження показали також, що після 8–9 пересівів культура взагалі втрачає здатність синтезувати полісахарид, особливо на середовищі зі співвідношенням $\text{N} : \text{C} = 1 : 3$, і поновлює цю здатність лише після проходження процесу споруляції або значного збільшення співвідношення $\text{N} : \text{C}$.

Отже, встановлено, що оптимальною формою азоту для штаму *B. mucilaginosus* C-3 є



Рис. 3. Вплив кількості пересівів на здатність синтезувати позаклітинний полісахарид за різних концентрацій KNO_3 .

Примітка: 1 — посівний матеріал — спори; 2 — посівний матеріал — вегетативні клітини другого пересіву; 3 — посівний матеріал — вегетативні клітини четвертого пересіву; 4 — посівний матеріал — вегетативні клітини шостого пересіву.

нітратна форма азоту, за якої накопичується найбільша кількість біомаси і проходить процес спорування, чого не забезпечує амонійна форма азоту.

Вміст у середовищі А 2,5 г/л нітрату кальцію забезпечує максимальне накопичення як біомаси, так і позаклітинного полісахариду *B. mucilaginosus*.

Інтенсивність використання азоту культурою *B. mucilaginosus* залежить від фізіологічного стану клітин посівного матеріалу: за використання посівного матеріалу у вигляді спор утворюється максимальна кількість біомаси і позаклітинного полісахариду.

Зі збільшенням кількості пересівів культури *B. mucilaginosus* у вегетативному стані ефективність використання джерела азоту і здатність до синтезу екзополісахариду суттєво зменшується: за другого пересіву — на 20,0 %, за четвертого — на 56,5 %, за шостого — на 127,8 %.

1. Пестова О. В. Биосинтез экзополисахаридов бактериями *Bacillus mucilaginosus* в глубинных условиях культивирования и новый аспект их использования : автореф. дисс. ... канд. биол. наук : 03.00.23 / О. В. Пестова. — СПб., 2000. — 21 с.

2. А. с. 1210452 СССР, МКИ С 12 N 1/00.

Штамм бактерии *Bacillus mucilaginosus* — продуцента биостимулятора неспецифического иммунитета телят / Е. Я. Виноградов, В. П. Шишкина. — № 3474518/15 ; опубл. 27.09.96, бюл. № 12.

3. Nyanikova G. G. Immobilization of *Bacillus mucilaginosus*, a producer of exopolysaccharides, on chitin / G. G. Nyanikova, E. E. Kuprina, O. V. Pestova // Appl. Biochem. and Microb. — 2002. — Vol. 38, № 3. — P. 259–262/

4. Авакян З. А. Характеристика нового вида *Bacillus mucilaginosus* / З. А. Авакян, Т. А. Пивоварова, Г. И. Каравайко // Микробиология. — 1986. — Т. 55, № 3. — С. 477–482.

5. Биологические особенности штамма *Bacillus mucilaginosus*, выделенного из дерново-подзолистых почв УССР / [В. С. Подгорский, Е. Н. Громозова, А. И. Болдарева и др.] // Микробиология. — 1991. — Т. 60, № 4. — С. 709–712.

6. Александров В. Г. Бактерии, разрушающие алюмосиликаты / В. Г. Александров, Г. А. Зак // Микробиология. — 1950. — Т. 19, № 2. — С. 97–104.

7. Сурман К. И. О почвенных бактериях, близких к виду *Bacillus mucilaginosus* : автореф. дисс. ... канд. биол. наук / К. И. Сурман. — М., 1962. — 21 с.

8. Терновская М. И. К физиологии силикатных бактерий / М. И. Терновская // Бюлл. НТИ по сел.-хоз. микробиол. — 1957. — № 3. — С. 15–20.

ПРОДУКТИВНОСТЬ СИНТЕЗА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА *BACILLUS* *MUCILAGINOSUS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСТОЧНИКА АЗОТА И ПРОИСХОЖ- ДЕНИЯ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА

И. М. Малиновская

Национальный научный центр «Институт земледелия НААН», п. г. т. Чабаны

Установлено, что *Bacillus mucilaginosus* C-3 нуждается во внесении в среду культивирования источника азота в нитратной форме, при которой накапливается максимальное количество биомассы и проходит процесс споруляции, чего не обеспечивает аммонийная форма азота. Эффективность использования источника азота *B. mucilaginosus* зависит от физиологического состояния клеток посевного материала: при засеивании среды посевным материалом в виде спор оптимальная для роста концентрация нитрата калия составляет 2,5 г/л и накапливается 10^{10} кл./мл, при засеивании среды вегетативными клетками оптимальная концентрация нитрата калия составляет 1,0 г/л и накапливается 10^9 кл./мл.

Споровый посевной материал обеспечивает максимальную продуктивность синтеза внеклеточного полисахарида. С увеличением количества пересевов *B. mucilaginosus* в вегетативном состоянии уменьшается эффективность использования азота и продуктивность синтеза экзополисахарида: после второго посева — на 20,0 %, после четвертого — на 56,5 %, после шестого — на 127,8 %. Через 8–9 пересевов культура теряет способность синтезировать полисахарид, особенно на среде с соотношением N : C = 1 : 3, и возобновляет эту способность только после прохождения процесса споруляции или значительного повышения соотношения N : C.

Ключевые слова: *Bacillus mucilaginosus*, экзополисахарид, источник азота, посевной материал, споры.

EXOPOLYSACCHARIDE SYNTHESIS PRODUCTIVITY BY *BACILLUS* *MUCILAGINOSUS* DEPENDING ON THE NITROGEN SOURCE AND ORIGIN OF INOCULUM

I. M. Malinovska

National Scientific Center “Institut of Agricultural UAAS”, Chabany

It was established that *Bacillus mucilaginosus* C-3 requires introduction of nitrogen source into the culture medium in form of nitrate as the most optimal for maximal accumulation of bacterial biomass and sporulation process. Introduction of the ammonium form was less efficient. It was shown that the intensity of nitrogen source use by *B. mucilaginosus* is highly depended on the physiological state of the inoculum cells. At sowing of spore inoculum the optimal concentration of potassium nitrate was 2.5 g/l resulting in 10^{10} cells/ml, while under the use of vegetative cells the optimal concentration of potassium nitrate was 1.0 g/l leading to the accumulation of 10^9 cells/ml.

Use of spore inoculum had ensured the maximum productivity of extracellular polysaccharide synthesis. With the higher number of *B. mucilaginosus* subcultures in a vegetative state the efficiency of the exopolysaccharide synthesis has decreased: after the second passage — by 20.0 %, after the fourth — by 56.5 %, after the sixth — at 127.8 %. After eighth passage the culture loses its ability to synthesize polysaccharide, especially on the medium with the N : C ratio 1 : 3 and resume this ability only after sporulation and the significant increase of the N : C ratio.

Key words: *Bacillus mucilaginosus*, exopolysaccharide, nitrogen source, inoculum, spores.