

УДК 579.22.852.1.64

СВОЙСТВА *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 И ЕГО СТРЕПТОМИЦИНУСТОЙЧИВОГО ШТАММА

© 2011 г. А. А. Рой, И. П. Яценко, А. С. Гордиенко, И. К. Курдиш

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, 03680

e-mail: Kurdish@serv.imv.kiev.ua

Поступила в редакцию 30.10.2009 г.

Изучены свойства фосфатмобилизирующих бактерий *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 и его стрептомицинустойчивого штамма. При выращивании в среде с глюкозой и глицерофосфатом удельная скорость роста маркированного по антибиотику штамма была примерно одинаковой с *B. subtilis* ИМВ В-7023, а размеры клеток в 1.3 раза меньше. Оба штамма существенно стимулировали прорастание семян растений, адгезировались на их корнях, незначительно отличались антагонистической активностью к фитопатогенам, количественным составом клеточных жирных кислот и фосфатазной активностью. Стрептомицинустойчивый штамм может использоваться для мониторинга *B. subtilis*, интродуцированных в агроэкосистемы.

Интенсивное использование химических удобрений и средств защиты растений сопровождается нарушением экологического равновесия в природных экосистемах. Поэтому в настоящее время остро стоит вопрос об уменьшении их применения и использовании для коррекции микробиологических процессов в агроэкосистемах бактериальных препаратов [1]. В отделе микробиологических процессов на твердых поверхностях Института микробиологии и вирусологии НАН Украины создан гранулированный препарат комплексного действия для растений. В состав препарата введены высокоактивный штамм азотфиксатора *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 и фосфатмобилизирующих бактерий *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023, а также природные высокодисперсные глинистые минералы [2, 3]. Эти препараты улучшают азотное и фосфорное питание растений, заметно стимулируют их рост и развитие, защищают от фитопатогенов [4, 5]. Однако малоизученным остается процесс взаимодействия интродуцированных бактерий с растениями и другими компонентами почвенной экосистемы. Для таких исследований применяют маркированные штаммы бактерий, в том числе и устойчивые к антибиотикам [6–8]. Полученные мутанты могут существенно отличаться от исходного штамма по основным биологическим свойствам.

Цель работы — изучение биологических свойств *B. subtilis* ИМВ В-7023 и стрептомицинустойчивого штамма этих бактерий для оценки возможности использования последнего в модельных экспериментах по исследованию взаимодействия с разными компонентами агроэкосистемы.

МЕТОДИКА

Объектом исследований был штамм *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023, выделенный из черноземной почвы Украины, активно мобилизирующий фосфор из труднорастворимых органических и неорганических соединений, а также типовой штамм *Bacillus subtilis* ATCC 115 [2, 5]. Стрептомицинустойчивый штамм *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 *str*⁺ был получен методом спонтанного мутагенеза при пересевах исходного штамма *B. subtilis* ИМВ В-7023 на среды с возрастающими концентрациями антибиотика. В отличие от исходного штамма он способен расти в питательных средах, содержащих 1600 мкг/мл стрептомицина.

Культивирование бактерий проводили в периодических условиях при 28°C в течение 3 сут на качалке (240 об/мин) в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих 100 мл питательной среды следующего состава (г/л): глицерофосфат кальция — 2.0, (NH₄)₂SO₄ — 0.5, MgSO₄ · 7H₂O — 0.3, NaCl — 0.3, KCl — 0.3, FeSO₄ — 0.001, MnSO₄ · 5H₂O — 0.001, CaCO₃ — 5.0, pH 6.9–7.1. В экспериментах использовали различные варианты среды. В первом варианте глицерофосфат являлся единственным источником углеродного и фосфорного питания для бактерий. Во втором варианте в данную среду дополнительно вносили глюкозу (10.0 г/л). Среду инокулировали суспензией 1 сут культуры бацилл после роста на агаризованной среде. Начальная численность бактерий в среде составляла (2.8–5.6) × 10⁵ кл./мл.

Интенсивность роста микроорганизмов оценивали по увеличению количества жизнеспособных клеток, численность которых определяли методом высева из серийных разведений на поверхность агаризованной картофельной среды и подсчетом выросших колоний. Концентрацию фосфата в среде определяли методом Фиске–Суббароу [9]. Антаго-

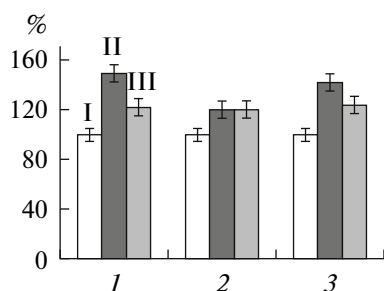


Рис. 1. Всхожесть семян растений после их обработки *B. subtilis* ИМВ В-7023 и *B. subtilis* ИМВ В-7023 *str+*: 1 – сахарная свекла, 2 – кукуруза сорта Титан, 3 – сосна обыкновенная; I – контроль, II – *B. subtilis* ИМВ В-7023, III – *B. subtilis* ИМВ В-7023 *str+*.

нистическую активность бактерий исследовали методом блоков [10]. Чувствительность *B. subtilis* ИМВ В-7023 и стрептомицинустойчивого штамма к антибиотикам определяли методом диффузии в агар с использованием стандартных бумажных дисков [10]. Всхожесть семян растений изучали согласно ДСТУ 4138-2002 Украины.

Жирнокислотный состав клеточных липидов исследовали после получения метиловых эфиров жирных кислот путем гидролиза бактериальной биомассы в метаноле, содержащем 1.5% H_2SO_4 . Экстракцию метиловых эфиров проводили смесью диэтиловый эфир–гексан (1 : 1). Анализ метиловых эфиров жирных кислот проводили в хромато–масс–спектрометрической системе Agilent 6890N/5973 inert (“Agilent Technologies”, США). Колонка капиллярная HP-5ms (“J&W Scientific”, USA), длина 30 м, внутренний диаметр 0.25 мм, толщина фазы 0.25 мкм. Температурный режим – 150–250°C, градиент температуры 4°C/мин, газ–носитель–гелий, скорость потока через колонку 1.2 мл/мин. Температура испарителя 250°C с разделением потока 1 : 100. Обработку результатов проводили с помощью персонального компьютера и стандартной смеси метиловых эфиров жирных кислот (производитель “Supelco”, США).

Фосфатазную активность определяли колориметрическим методом, используя в качестве модельного субстрата фенолфталейнфосфат натрия. За единицу активности принимали количество фермента, которое содержалось в 1 г клеток (в пересчете на сухую массу) и катализировало превращение 1 мкМ субстрата за 1 ч [11].

Исследование электроповерхностных свойств бактерий проводили на установке для микроэлектрофореза [12]. Для этого выращенные клетки отмывали дважды в соответствующих буферных растворах (ионная сила 0.05), которые получали смешиванием растворов NaCl и HCl (диапазон pH 2.0–4.0) либо использовали фосфатный буфер (диапазон pH 5.0–8.0). В этих растворах измеряли скорость электрофореза пятидесяти клеток каждого варианта и рассчитывали их ζ -потенциал [13].

Адгезию бактерий на корнях огурцов изучали известным методом [14]. Результаты обрабатывали статистически [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методом спонтанного мутагенеза был получен штамм *B. subtilis* ИМВ В-7023 *str+*, резистентный к стрептомицину в концентрации 1600 мкг/мл. Этот штамм стабильно сохранял устойчивость к антибиотикам после 55 пассажей на картофельном агаре в течение 2 лет. Как исходный, так и стрептомицинустойчивый штаммы оказывали стимулирующее влияние на прорастание семян и развитие проростков разных видов растений. Так, при бактериализации семян сахарной свеклы сорта Экстра, кукурузы сорта Титан и сосны обыкновенной суспензией *B. subtilis* ИМВ В-7023 их всхожесть была соответственно на 49, 23 и 57% выше контрольных (небактериализованные семена), а *B. subtilis* ИМВ В-7023 *str+* – на 23, 14 и 25% (рис. 1). Положительное влияние обработки семян суспензиями клеток обоих штаммов наблюдали и при учете показателей длины проростков и корня. При этом также имело место снижение поражаемости семян и проростков микромицетами на 85–95% при использовании клеток исходного штамма и на 65–88% – стрептомицинустойчивого.

Показано, что оба штамма не отличались между собой по основным морфо–физиологическим свойствам: окраска по Граму, подвижность, ферментация источников углеродного питания и др. В то же время наблюдались незначительные различия скорости роста при выращивании на минеральной среде с глицерофосфатом и глюкозой. Так, количество клеток исходного штамма при выращивании на такой среде достигало максимума на 2 сут роста, а стрептомицинустойчивого – на 3 сут. Размеры клеток *B. subtilis* ИМВ В-7023 *str+* были в 1.3 раза меньше *B. subtilis* ИМВ В-7023.

Одной из важных характеристик исходного штамма является его высокая антагонистическая активность к ряду фитопатогенов растений [4]. У стрептомицинустойчивого штамма эта активность была на 3–10% ниже, чем у исходного штамма, а к фитопатогену *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 80036b была утрачена (рис. 2).

При определении чувствительности к ряду антибиотиков было показано, что клетки стрептомицинустойчивого штамма характеризовались более выраженной резистентностью к макролидам (олеандомицин и эритромицин), но становились более чувствительными к ампициллину, доксициклину, тетрациклину, гентамицину и цефтриаксону (табл. 1). Полученные результаты, по нашему мнению, необходимо учитывать при изучении поведения клеток обоих штаммов в агроэкосистемах.

Известно, что важным таксономическим показателем для бактерий является состав их кле-

точных жирных кислот [16]. Последние являются неотъемлемыми компонентами ряда макромолекул клеточных стенок и могут влиять на их структурные и функциональные особенности. С этой точки зрения представляло интерес изучение жирнокислотного состава липидов клеток исходного и стрептомицинустойчивого штаммов. Полученные данные свидетельствуют, что у исходного, *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 *str+*, а также типового штамма *Bacillus subtilis* 115 выявлены 12 типов насыщенных и ненасыщенных жирных кислот с длиной углеродной цепи от C₁₄ до C₁₈. В жирнокислотных спектрах исследованных бактерий преобладали: 12-метилтетрадекановая (α -C_{15:0}), 14-метилпентадекановая (i-C_{15:0}), 13-метилтетрадекановая (i-C_{15:0}), 12-метилтридекановая (i-C_{14:0}), гексадекановая (C_{16:0}), 14-метилгексадекановая (α -C_{17:0}), 15-метилгексадеценонная (i-C_{17:1}) кислоты. В качестве вторичных компонентов содержались также кислоты: тетрадекановая, пентадекановая, гептадекановая, октадекановая и цис-9-октадеценонная кислоты (табл. 2). Известно, что для представителей рода *Bacillus* характерно преобладание в жирнокислотном спектре кислот с разветвленной цепью (от 54 до 85% общего количества жирных кислот). У *Bacillus* многих видов отмечен высокий уровень α -C_{17:0} и i-C_{17:1} кислот, а у *B. subtilis*, в частности, α -C_{15:0}, i-C_{15:0}, а также i-C_{16:0} жирных кислот [17]. Полученные нами результаты также подтвердили наличие этих кислот в клетках как типового, так и изучаемых штаммов *Bacillus* (табл. 2). Исследованные культуры отличались друг от друга, главным образом, количественным содержанием отдельных кислот. Так, клетки стрептомицинустойчивого штамма содержали пентадекановую кислоты в 1.6 раза, гексадекановую в 1.5 раза, 15-метилгексадеценонную — в 1.2 раза; 14-метилгексадекановую — в 1.4 раза больше, чем у *B. subtilis* ИМВ В-7023. В то же время количество 14-метилпентадекановой кислоты было в 1.2 раза меньше по сравнению с исходным штаммом (табл. 2), а также клетки маркированного штамма содержали в незначительной концентрации цис-9-октадеценонную кислоту.

Таким образом, типовая культура *B. subtilis* 115, исходный штамм *B. subtilis* ИМВ В-7023 и его стрептомицинустойчивый мутант существенно не отличались по качественному составу клеточных жирных кислот, что может служить одним из критериев идентификации этого вида *Bacillus* в агроэкосистемах.

Наиболее важной характеристикой исходного штамма является способность мобилизовать фосфат из труднорастворимых органических и неорганических соединений фосфора. Одним из таких соединений является глицерофосфат. Известно, что в минеральной среде с глюкозой и глицерофосфатом клетки с помощью фосфатазы отщепляют фосфат от молекулы глицерофосфата, используя его в качестве источника фосфора, а глюкозу — в качестве источника углерода [18]. Было показано, что при культивировании в таких условиях как исходного, так и стрепто-

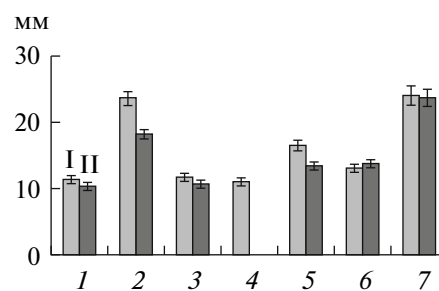


Рис. 2. Антагонистическая активность *B. subtilis* ИМВ В-7023 и *B. subtilis* ИМВ В-7023 *str+* к фитопатогенным бактериям: 1 — *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 8511, 2 — *P. fluorescens* 8573, 3 — *Agrobacterium tumefaciens* 6628, 4 — *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 80036b, 5 — *Pectobacterium caratovororum* 8982, 6 — *P. syringae* pv. *atropaciens* 912, 7 — *Clavibacter michiganensis* 10; I — *B. subtilis* ИМВ В-7023, II — *B. subtilis* ИМВ В-7023 *str+*.

мицинустойчивого штаммов в среде происходит накопление фосфата (рис. 3). При этом у *B. subtilis* ИМВ В-7023 *str+* отмечали незначительное снижение удельной скорости роста. Кроме того, наблюдали различия в показателях фосфатазной активности этих штаммов. Так, если у исходного штамма фосфатазная активность проявлялась уже после 9 ч выращивания, то у стрептомицинустойчивого штамма ее обнаруживали только после 20 ч культивирования. В зависимости от времени культивирования фосфа-

Таблица 1. Чувствительность к антибиотикам *B. subtilis* ИМВ В-7023 и *B. subtilis* ИМВ В-7023 *str+*.

Антибиотик	Диаметр зоны ингибирования роста клеток <i>Bacillus</i> антибиотиками, мм	
	<i>B. subtilis</i> ИМВ В-7023	<i>B. subtilis</i> ИМВ В-7023 <i>str+</i>
Цефтриаксон	34.0 ± 0.7	37.7 ± 0.4
Доксициклин	26.0 ± 0.7	31.3 ± 1.1
Ванкомицин	23.7 ± 0.8	24.0 ± 0.7
Гентамицин	27.3 ± 0.4	31.7 ± 1.1
Тетрациклин	22.0 ± 0.7	29.7 ± 0.4
Неомицин	18.7 ± 1.1	19.0 ± 1.9
Левомецетин	33.0 ± 1.9	35.3 ± 1.8
Линкомицин	26.0 ± 0.7	25.0 ± 0.7
Канамицин	26.5 ± 0.7	24.0 ± 0.7
Бензилпенициллин	25.5 ± 2.1	25.0 ± 1.4
Полимиксин	10.7 ± 1.5	9.3 ± 0.5
Олеандомицин	25.0 ± 0.7	11.0 ± 0.7
Ампициллин	8.7 ± 0.4	21.7 ± 1.1
Эритромицин	36.0 ± 0.7	25.3 ± 0.4
Стрептомицин	20.3 ± 1.8	—

Таблица 2. Жирнокислотный состав клеточных липидов *B. subtilis* ИМВ В-7023 и *B. subtilis* ИМВ В-7023 *str+*, % от общей площади пиков

Кислота	Условное обозначение кислоты	<i>Bacillus subtilis</i> ИМВ В-7023	<i>Bacillus subtilis</i> ИМВ В-7023 <i>str+</i>	<i>Bacillus subtilis</i> 115
12-метилтетрадекановая	i-C _{14:0}	10.73	7.34	5.94
Тетрадекановая	C _{14:0}	0.28	0.27	0.54
13-метилтетрадекановая	i-C _{15:0}	12.71	11.96	17.84
12-метилтетрадекановая	α-C _{15:0}	38.7	37.23	37.02
Пентадекановая	C _{15:0}	0.85	1.36	0.81
14-метипентадекановая	i-C _{16:0}	22.8	19.02	25.13
Гексадекановая	C _{16:0}	6.49	10.05	3.51
15-метилгексадеценная	i-C _{17:1}	2.54	2.99	1.62
14-метилгексадекановая	α-C _{17:0}	4.80	6.79	6.76
Гептадекановая	C _{17:0}	Сл.	0.27	—
Цис-9-октадеценная	C _{18:1} -цис	—	1.90	—
Октадекановая	C _{18:0}	Сл.	0.54	—

* Сл. — следы кислоты, “—” не обнаружено.

тазная активность маркированного штамма была в 1.3–3.0 раза ниже, чем у исходного.

В природных экосистемах микроорганизмы функционируют в олиготрофных условиях. Поэтому представляло интерес исследовать возможность использования бактериями глицерофосфата как источника углерода и фосфора одновременно. Установлено, что при выращивании бактерий в таких условиях оба штамма использовали это вещество в качестве единственного источника углерода и фосфора, накапливая в среде фосфат. Следует отметить, что в этом варианте эксперимента фосфатазную активность у обоих штаммов не обнаруживали. Очевидно, в данном случае деструкция молекул глицерофосфата идет по пути преимущественного использования клетками углеродной его части, а

фосфат лишь частично ассимилируется ими и накапливается в среде, ингибируя в высоких концентрациях фосфатазную активность бактерий [18].

Основной вклад в реализации стимулирующего потенциала микробных препаратов принадлежит бактериям, способным колонизировать ризосферу растений. Первым этапом колонизации является адгезия бактерий на твердых поверхностях, а эффективность данного процесса детерминруется свойствами поверхности клеток. Установлено, что как исходный, так и стрептомицинустойчивый штаммы при выращивании в среде с одним глицерофосфатом (природный компонент почвы) характеризуются подобным типом поверхности (рис. 4). Это позволяет предположить, что клетки как *B. subtilis* ИМВ В-7023, так и *B. subtilis* ИМВ В-7023 *str+* имеют равные воз-

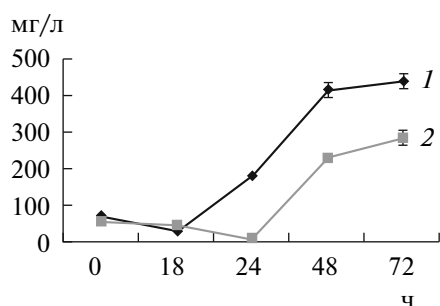


Рис. 3. Зависимость концентрации фосфата от времени выращивания (ч) *B. subtilis* ИМВ В-7023 (1) и *B. subtilis* ИМВ В-7023*str+* (2) в среде с глицерофосфатом и глюкозой.

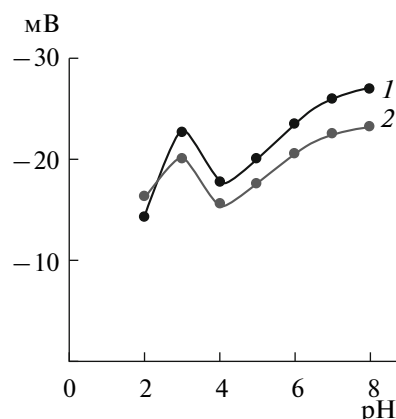


Рис. 4. ζ-потенциал клеток (мВ) *B. subtilis* ИМВ В-7023 *str+* (1) и *B. subtilis* ИМВ В-7023 (2), выращенных в среде с глицерофосфатом.

возможности участия в процессе колонизации ризосферы растений. Действительно, показано, что адгезия клеток исходного штамма бациллы на поверхности корней огурцов сорта Джерело составляла $(1.6 \pm 0.2) \times 10^7$ кл./г корней, а стрептомицинустойчивого — $(1.5 \pm 0.2) \times 10^7$ кл./г.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что стрептомицинустойчивый штамм характеризуется сходными биологическими свойствами с природным *B. subtilis* ИМВ В-7023 и может быть использован для мониторинга популяции этого вида бацилл в агроэкосистемах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Курдиш И.К., Рой А.А., Чуйко Н.В., Белогубова Е.Н., Церковняк Л.С., Дыренко Д.И. // Материалы Всерос. конф. с междуна. участием "Фундаментальные и прикладные аспекты исследования симбиотических систем" Саратов 25–27 сентября 2007 г. Саратов: Изд-во Научная книга, 2007. С. 11.
2. Патент Украины. 2003. № 54923.
3. Курдиш И.К. Гранулированные микробные препараты для растениеводства: наука и практика. Киев: КВЦ, 2001. 142 с.
4. Рой А.А., Залоило О.В., Чернова Л.С., Курдиш И.К. // Агрэкол. журнал. 2005. № 1. С. 50–55.
5. Рой А.А., Рева О.Н., Курдиш И.К., Смирнов В.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 5. С. 551–557.
6. Вязовая А.А., Лимещенко Е.В., Бурень В.М. // Микробиология. 2006. Т. 75. № 5. С. 689–695.
7. Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Нехотяева Н.В., Ицкович Е.Л., Шакиров Е.В., Лецинская И.Б., Руденская Г.Н. // Биохимия. 1996. Т. 61. № 1. С. 110–118.
8. Суховицкая Л.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 1998. Т. 34. № 1. С. 87–90.
9. Унифицированные методы анализа вод / Ред. Ю.Ю. Лурье. М.: Химия, 1971. 207 с.
10. Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. М.: Изд-во МГУ, 1976. 307 с.
11. Калашникова Н.А., Родзевич В.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 1971. Т. 7. № 4. С. 446–450.
12. Глоба Л.И., Гордиенко А.С. // Медтехника. 1980. № 2. С. 50–51.
13. Духин С.С., Дерягин Б.В. Электрофорез. М.: Наука, 1976. 328 с.
14. Курдиш И.К., Бега З.Т., Гордиенко А.С., Дыренко Д.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 4. С. 442–447.
15. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1968. 24 с.
16. Stead D.A. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1992. V. 42. № 2. P. 281–295.
17. Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Споробразующие аэробные бактерии — продуценты биологически активных веществ. Киев.: Наукова думка, 1982. 279 с.
18. Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Лецинская И.Б. // Микробиология. 2000. Т. 69. № 2. С. 410–413.

Features of *Bacillus subtilis* IMB В-7023 and Its Streptomycin-Resistant Strain

A. A. Roi, I. P. Yatzenko, A. S. Gordienko, and I. K. Kurdish

Zabolotnyi Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences, Kiev, 03680 Ukraine

e-mail: kurdish@serv.imv.kiev.ua

Received October 30, 2009

Abstract—Features of phosphate-mobilizing bacteria *Bacillus subtilis* IMB В-7023 and its streptomycin-resistant strain were investigated. While cultivated in medium with glucose and glycerophosphate, the growth rate of the antibiotic-marked strain was approximately similar to this parameter for *Bacillus subtilis* IMB В-7023 but cell sizes were 1.3-fold less. Both strains significantly stimulated the germinating of plant seeds, attached to their roots, and insignificantly differed in antagonistic activity toward phytopathogens and quantitative content of cell fatty acids and phosphatase activity. Streptomycin-resistant strain may be used for monitoring of *Bacillus subtilis* introduced to agroecosystem.