

**Рой А.А.<sup>1</sup>, Курдиш И.К.<sup>1</sup>, Остапюк С.Н.<sup>2</sup>, Савельев Ю.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Акад. Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

<sup>2</sup>Институт химии высокомолекулярных соединений НАН Украины,  
Харьковское шоссе, 48, Киев, 02160, Украина

## **ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ BACILLUS SUBTILIS ИМВ В-7023 И ЕГО СТРЕПТОМИЦИНУСТОЙЧИВОГО МУТАНТА НА СВОЙСТВА ПОВЕРХНОСТИ ЭТИХ БАКТЕРИЙ**

**Цель.** Исследование влияния условий культивирования *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 и его стрептомицинустойчивого мутанта в среде с глицерофосфатом на свойства поверхности клеток методом ИК-Фурье спектроскопии. **Методы.** В работе использовали микробиологические, химические, физические, биохимические, статистические методы исследования. Бактерии выращивали в минеральной среде с глицерофосфатом как единственным источником фосфора и углерода или же с глицерофосфатом и глюкозой. Спектры характерных составляющих поверхности клеток *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 и его мутанта снимали методом ИК-спектроскопии с Фурье преобразованием на отражение на приборе Tensor 37 фирмы Bruker. **Результаты.** Условия культивирования бактерий в среде с глицерофосфатом, как единственным источником фосфора и углерода, или же с глицерофосфатом и глюкозой существенно влияли на свойства поверхности клеток. Используя метод ИК-спектроскопии с Фурье преобразованием, были получены ИК-спектры поверхностей клеток, которые свидетельствуют об изменениях в характеристиках интенсивности пиков. В зависимости от источника углеродного питания на поверхности клеток происходило перераспределение тех или иных функциональных групп, в основном отвечающих за амидную (белковую) группу NH-CO и простую эфирную связь C-O, а также группы P-O и P-O-C. **Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют о возможности утилизации глицерофосфата *Bacillus subtilis* не только на поверхности клеток, как это имело место в случае его использования бактериями в качестве источника фосфора (где основную роль играли фосфатазы, связанные с поверхностными структурами бацилл), а также и об участии других ферментов, способных разлагать данное соединение по месту углеродных связей в молекуле, что позволяет использовать его в качестве источника углерода и фосфора одновременно.

**Ключевые слова:** *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023, стрептомицинустойчивый мутант, поверхность клеток бактерий, ИК- спектры.

ИК-спектроскопия с Фурье преобразованием в настоящее время все шире используется в микробиологии для детекции вегетативных клеток микроорганизмов, а также спор бактерий [1,2]. Установлено, что разные виды микроорганизмов характеризуются индивидуальными Фурье спектрами. Этот эффект обусловлен уникальным для каждого вида набором макромолекул (белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот), что позволяет дифференцировать бактерии на разных таксономических уровнях – подвидов, сероваров и штаммов. Показано, что с помощью ИК

Фурье спектроскопии можно дифференцировать штаммы одного рода бактерий с высокой точностью. Эффективность применения этого метода доказана при идентификации различных видов микроорганизмов, в том числе молочнокислых бактерий, дрожжей, патогенных бактерий, бацилл и др. микроорганизмов с достоверностью 93,2 – 97,1%. Это позволило получить информацию о структуре определенных фракций бактерий (клеточных стенок, цитоплазматического вещества, пептидогликана, тейхоевых кислот, ДНК) [3, 4, 5, 6]. Такая возможность обусловлена тем, что ИК-спектры поглощения характерных групп не зависят от каркаса всей молекулы и не меняются при переходе от одного соединения к другому [1, 7]. С помощью ИК-спектроскопии можно идентифицировать разнообразные функциональные группы: гидроксильные, карбонильные, карбоксильные, амина, амидные и др., а также двойные и тройные углерод-углеродные связи, образование водородных связей [1].

Известно, что при выращивании *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 в среде с глицерофосфатом клетки способны усваивать это соединение в качестве источника энергии, углерода и фосфора либо фосфора в среде с глюкозой, что приводило к изменению их физиологической активности [8].

Целью работы было изучение влияния условий культивирования *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 и его стрептомицинустойчивого мутанта в среде с глицерофосфатом на свойства поверхности клеток методом ИК-Фурье спектроскопии.

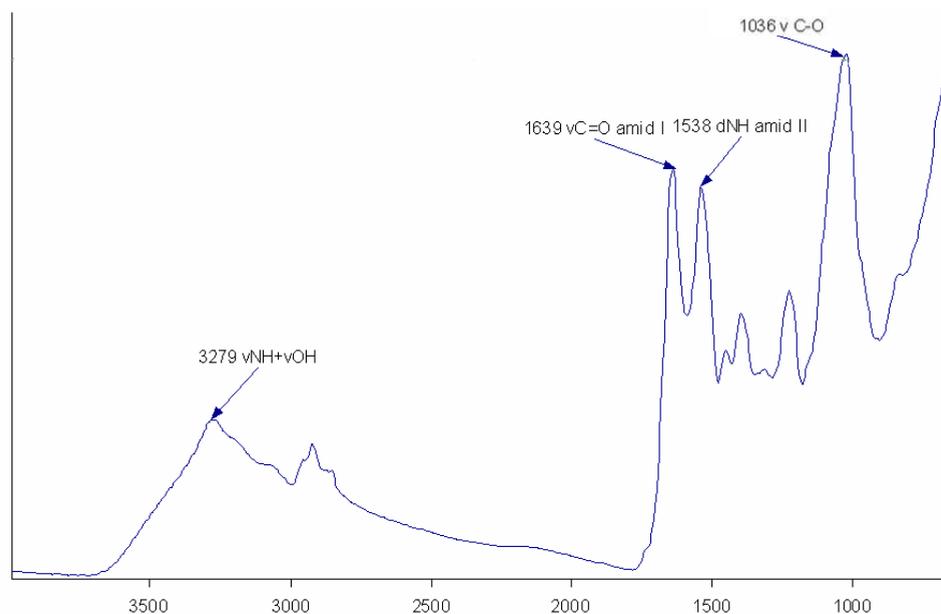
**Материалы и методы.** Объектами исследований были штамм *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 – компонент комплексного бактериального препарата для растениеводства [9,10] – и его устойчивый к стрептомицину (1600 мкг/мл) мутант, полученный методом спонтанного мутагенеза [8]. Оба штамма активно солубилизировали фосфор из его труднорастворимых неорганических и органических соединений (трикальцийфосфат, глицерофосфат, фитин) [11, 12].

Культивирование бактерий проводили в периодических условиях при 28°C на качалке (240 об/мин) в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих по 100 мл среды следующего состава (г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{NaCl}$  – 0,3;  $\text{KCl}$  – 0,3;  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,001;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001;  $\text{CaCO}_3$  – 5,0; глюкоза – 10,0; глицерофосфат кальция – 2,0, рН среды 7,0. В другом варианте культивирования в среду глюкозу не вносили. В этой среде глицерофосфат в указанной выше концентрации использовался клетками в качестве источника фосфора и углерода. После выращивания клетки осаждали центрифугированием на ОПН-8 при 5000g в течение 20 мин и дважды отмывали физиологическим раствором. Полученные таким образом клетки использовали для снятия спектров их поверхности методом ИК-спектроскопии с Фурье преобразованием на отражение на приборе Tensor 37 фирмы Bruker (метод НПВО, кристалл-алмаз,  $n=1$ ).

Статистическую обработку результатов осуществляли, определяя значения средних арифметических величин и среднее квадратическое отклонение с использованием критерия Стьюдента [13].

**Результаты.** Ранее нами было показано, что при выращивании *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 в минеральной среде с глицерофосфатом и глюкозой, либо в отсутствие последней, наблюдались отличия в физиологической активности популяции и электроповерхностных свойствах клеток [8]. Подтвердить полученные данные представляло интерес, используя при этом метод ИК-Фурье спектроскопии.

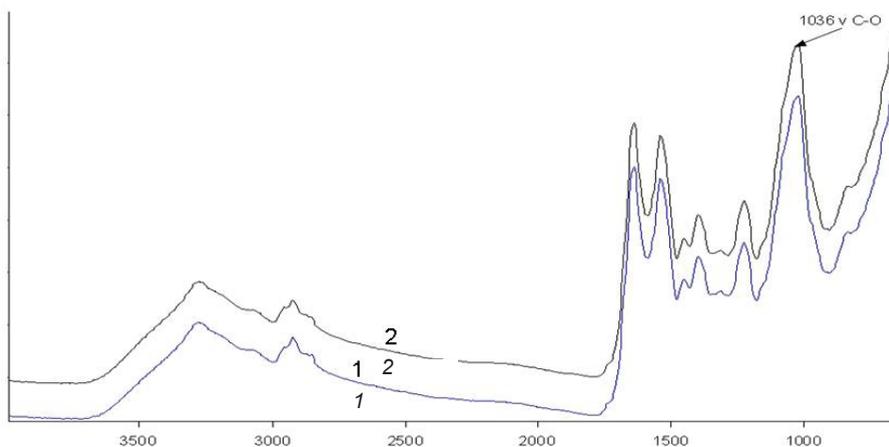
С помощью этого метода получены спектры поверхности клеток *B. subtilis* ИМВ В-7023, выращенных в минеральной среде с глюкозой и глицерофосфатом (рис.1). Наличие в спектре широкой полосы с максимумом поглощения  $3279\text{ см}^{-1}$  является характерным для  $\nu$ -колебания связанных N-H групп. Слабые полосы при  $3205$  и  $3070\text{ см}^{-1}$  отвечают за другие N-H группы, более сильные по энергии связи. Полосы  $1639$  и  $1538\text{ см}^{-1}$  – характерные полосы полиамида (белка) – амид I и амид II. Широкая полоса  $\nu$ -колебаний ( $3279\text{ см}^{-1}$ ), скорее всего, является тоже сложной, обусловленной  $\nu$ -NH и  $\nu$ -OH. Полученные результаты ИК-спектроскопии подтверждают литературные данные о возможности использования этого метода для исследований ассоциированных групп NH и OH на поверхности микроорганизмов [15].



**Рис. 1.** ИК-спектры клеток *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 после выращивания в среде с глюкозой и глицерофосфатом

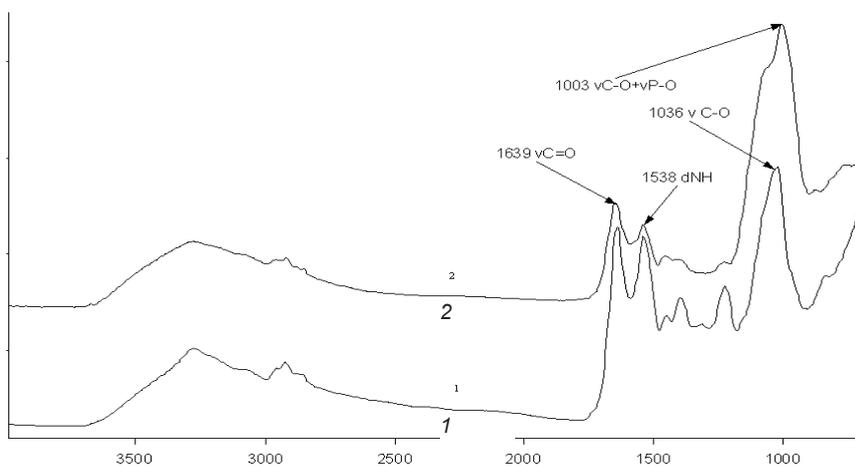
Сравнивая спектры поглощения поверхности клеток родительского штамма *B. subtilis* ИМВ В-7023 и его стрептомицинустойчивого мутанта (рис. 2) при выращивании обеих культур в среде с глюкозой и глицерофосфатом, нами отмечено, что спектры подобны. Единственное отличие – интенсивность сложной полосы с максимумом  $1036\text{ см}^{-1}$ . В спектре мутанта она более сильно выражена. Можно предположить, что мутации под действием стрептомицина влияют на водородные связи или другие группы  $\text{C=O}$ ,  $\text{C-O-C}$ ,  $\text{P-O}$ ,  $\text{P-O-C}$  поверхностного слоя клеток, а также на саму структуру поверхности клеток мутанта, что может привести к некоторому снижению их ферментативной активности. Однако это не при-

водило к существенным отклонениям их физиологической активности по сравнению с таковой родительского штамма [11].

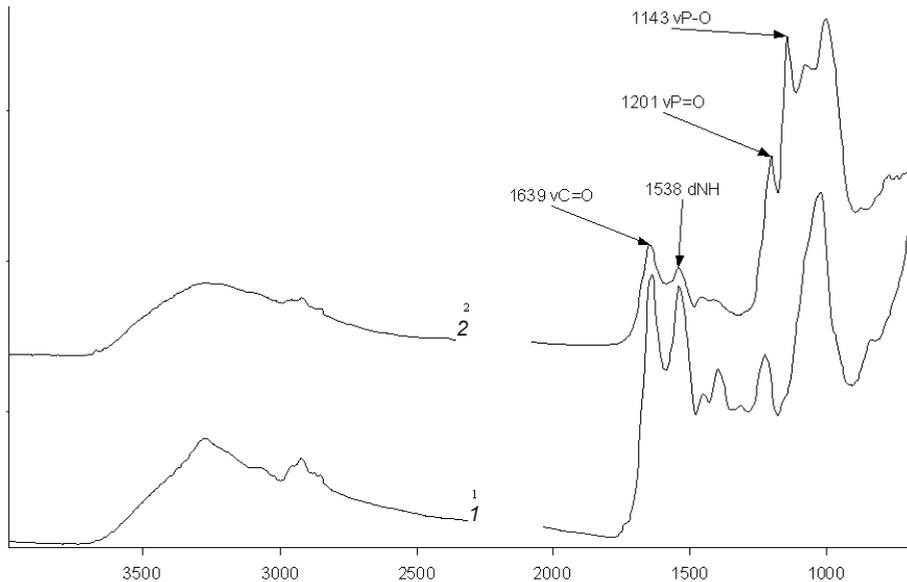


**Рис. 2.** ИК-спектры клеток исходного штамма *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 (1) и его стрептомицинустойчивого мутанта (2) после выращивания в среде с глюкозой и глицерофосфатом

После выращивания бактерий в среде с глицерофосфатом, который для клеток служил единственным источником углерода и фосфора, в спектрах зафиксировано перераспределение интенсивности полос амидных групп ( $1639$  и  $1538$   $\text{cm}^{-1}$ ) к сложной полосе с максимумом  $1003$   $\text{cm}^{-1}$ , отвечающей за связи C-O-H, C-O-C и P-O-C и др. (рис. 3). Такие же изменения, но более заметные, наблюдали в спектрах и для поверхностного слоя клеток мутанта после его выращивания в аналогичных условиях по интенсивности полосы P=O ( $1201$   $\text{cm}^{-1}$ ). Более интенсивно и четче видна полоса P-O-C ( $1143$   $\text{cm}^{-1}$ ) (рис. 4). Полученные данные, по-видимому, могут свидетельствовать об утилизации глицерофосфата бактериями не на поверхности клеток, как это имело место в случае его использования в качестве источника фосфора (где основную роль играли молекулы фосфатаз, связанные с поверхностными структурами клеток бацилл).



**Рис. 3.** ИК-спектры *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 (1) после выращивания в среде с глюкозой и глицерофосфатом (1) и в среде, содержащей глицерофосфат



**Рис. 4.** ИК-спектры клеток стрептомицинустойчивого мутанта *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 после его выращивания в среде с глюкозой и глицерофосфатом (1) и только с глицерофосфатом (2)

**Обсуждение.** ИК-спектроскопия уже давно используется для изучения поверхностных структурных компонентов микробных клеток [3,7]. Особенно информативным подходом является ИК-спектроскопия с преобразователем Фурье. Этот метод характеризуется высокой чувствительностью и точностью определения частот, малым временем регистрации спектра, возможностью регистрации слабых сигналов и другими преимуществами [2,3].

Ранее нами методом электрофореза было показано, что после выращивания *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 в среде с глицерофосфатом и глюкозой поверхность клеток этих бактерий характеризовалась положительным зарядом в диапазоне рН=3,4-2,0, что, как правило, было обусловлено наличием на поверхности клеток аминогрупп белковой природы [8].

Полученные нами ИК-спектры поверхности клеток этих бактерий, выращиваемых в вышеуказанных условиях, свидетельствуют о наличии широкой полосы с максимумом поглощения  $3279\text{ см}^{-1}$ , являющейся характерной для  $\nu$ -колебания связанных N-H групп. Слабые полосы при  $3205$  и  $3070\text{ см}^{-1}$  отвечают за другие N-H группы, более сильные по энергии связи. Определенную часть этих компонентов у *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 могут составлять в данном варианте эксперимента ферменты, обладающие фосфатазной активностью, разлагающие глицерофосфат, фосфатную группу которого бактерии использовали в качестве источника фосфора, в то время как источником углерода и энергии являлась глюкоза [11, 13, 14] (рис.5,6).

При выращивании *B. subtilis* в среде, где глицерофосфат был единственным источником углерода и фосфора, наблюдали изменения электроповерхностных свойств клеток [8]. В этом случае методом микроэлектрофореза было показано снижение содержания в поверхностном слое положительно заряженных ионогенных групп (аминогрупп). Даже

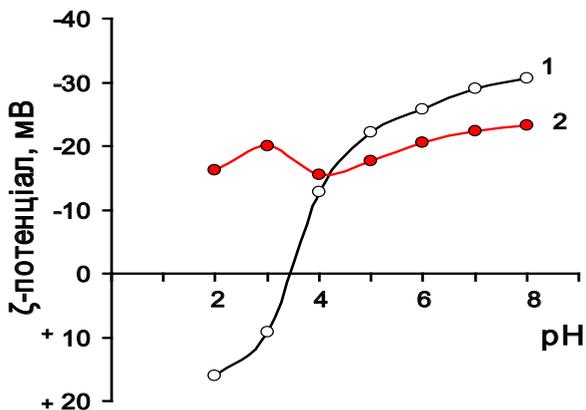


Рис. 5.  $\zeta$ -потенціал клеток *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023(1) и его стрептомицинустойчивого штамма (2), выращенных в среде с глицерофосфатом и глюкозой

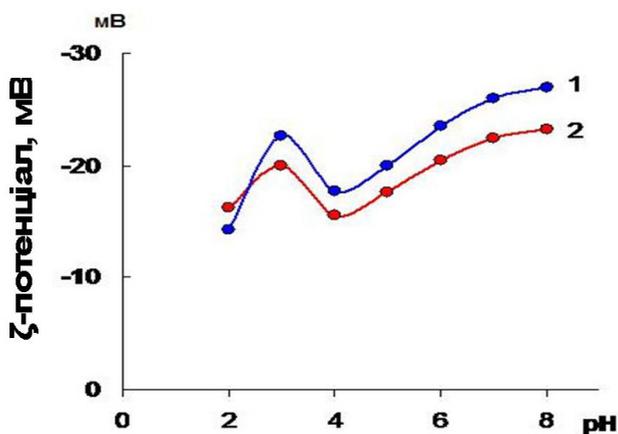


Рис. 6.  $\zeta$ -потенціал клеток (мВ) *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 str+ (1) и *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 (2), выращенных в среде с глицерофосфатом

при рН 2,0 поверхность бактерий имела отрицательный заряд. Такое явление может быть обусловлено преобладанием на поверхности клеток фосфорнокислых групп, диссоциация которых происходит в кислой зоне рН. При таких условиях культивирования бактерий в ИК-спектрах клеток наблюдали перераспределение интенсивности полос амидных групп ( $1639$  и  $1538$   $\text{см}^{-1}$ ) к сложной полосе с максимумом  $1003$   $\text{см}^{-1}$ , отвечающей за связи С-О-Н и С-О-С, Р=О и др.

Известно, что основными анионными полимерами клеток грамположительных бактерий являются как тейхоевые кислоты, имеющие фосфорнокислые группы, так и тейхуроновые кислоты, в состав которых входят карбоксильные группы [13,16]. По-видимому, изменением содержания на поверхности бактерий компонентов этих кислот и аминокислот в зависимости от условий культивирования и обусловлены отличия их ИК-спектров и электроповерхностных свойств *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023.

Таким образом, с помощью метода ИК-Фурье спектроскопии получены подтверждения отличий компонентов поверхности клеток *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023, выращиваемых в среде с глицерофосфатом, в за-

висимости от использования бактериями данного соединения в качестве источника фосфора при наличии глюкозы либо углеродного и фосфорного питания одновременно. Выявленные отличия связаны, в основном, с перераспределением интенсивности пиков, отвечающих за амидную (белковую) группу NH-CO и простую эфирную связь C-O, а также групп NH и OH на группы P-O и P-O-C поверхности данных микроорганизмов.

**Рой А.О.<sup>1</sup>, Курдиш І.К.<sup>1</sup>, Остапюк С.М.<sup>2</sup>, Савельєв Ю.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України,  
вул. Акад.Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

<sup>2</sup> Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України,  
Харківське шосе, 48, Київ, 02160, Україна

### **ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ *BACILLUS SUBTILIS* ІМВ В-7023 ТА ЙОГО СТРЕПТОМІЦИНСТІЙКОГО МУТАНТУ НА ВЛАСТИВОСТІ ПОВЕРХНІ ЦИХ БАКТЕРІЙ**

Резюме

**Мета:** Вивчення впливу умов культивування *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 та його стрептоміцинстійкого мутанту в середовищі з гліцерофосфатом кальцію на властивості поверхні клітин за допомогою методу інфрачервоної хроматографії з Фур'є перетворенням. **Методи.** В роботі були використані мікробіологічні, хімічні, фізичні, біохімічні та статистичні методи. Бактерії вирощували в мінеральному середовищі з гліцерофосфатом кальцію як джерелом фосфору та вуглецю або з гліцерофосфатом кальцію та глюкозою. Спектри характерних складових поверхні клітин *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 і його мутанту одержували методом ІК-спектроскопії з Фур'є перетворенням на відображення на приладі Tensor 37 фірми Bruker. **Результати.** Умови культивування бактерій в середовищі з гліцерофосфатом, як єдиним джерелом фосфору та вуглецю, або ж з гліцерофосфатом та глюкозою суттєво впливали на властивості поверхні клітин. Використовуючи метод ІК-спектроскопії з Фур'є перетворенням, були одержані ІК-спектри поверхні клітин, які свідчать про зміни в характеристиках інтенсивності піків. В залежності від джерела вуглецевого живлення на поверхні клітин відбувався перерозподіл тих чи інших функціональних груп, в основному, відповідних за амідну (білкову) групу NH-CO та простий ефірний зв'язок C-O, а також групи P-O і P-O-C. **Висновки.** Одержані результати свідчать про можливість утилізації гліцерофосфату *Bacillus subtilis* не тільки на поверхні клітин, як це мало місце у випадку використання бактеріями в якості джерела фосфору (де основну роль грали фосфатази, зв'язані з поверхневими структурами бацил), але й про участь інших ферментів, здатних розкладати дану сполуку за місцем вуглецевих зв'язків в молекулі, що дозволяє використовувати його в якості джерела вуглецю та фосфору одночасно.

**Ключові слова:** *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023, стрептоміцинстійкий мутант, поверхня клітин бактерій, ІК- спектри.

## INFLUENCE OF THE CULTIVATION CONDITIONS OF *BACILLUS SUBTILIS* IMV B-7023 AND ITS STREPTOMYCINRESISTANT MUTANT ON THE SURFACE PROPERTIES OF THESE BACTERIA

### Summary

**Aim:** It was to study the influence of the cultivation conditions of *Bacillus subtilis* IMV B-7023 and its streptomycin resistant mutant in medium with calcium glycerophosphate on surface characteristics of cells by the method Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Methods:** In this experimental work was used microbiological, chemical, physical, biochemical, and statistical methods. Bacteria were grown in a mineral medium with calcium glycerophosphate as phosphorus and carbon source simultaneously with or calcium glycerophosphate and glucose. Spectra characteristic components of the cell surface of *Bacillus subtilis* IMV B-7023 and its streptomycin resistant mutant were recorded by the method Fourier Transform Infrared Spectroscopy on the device FT-IR Spectrometer “Tensor-37” from Bruker. **Results:** The cultivation conditions of bacteria in medium with calcium glycerophosphate and various sources of carbon nutrition significantly affected the properties of their cell surface. FT-IR spectra of the surface of cells characterize redistribution of intensity peaks mainly responsible for amide group (protein) NH-CO and an ether bond C-O and groups P-O and P-O-C depending on the use of a source of carbon nutrition by bacteria. **Conclusion:** The obtained results showed the possibility of utilization of glycerophosphate not only on the cell surface, as was the case of its use bacteria as a source of phosphorus (where the main role played phosphatase associated with surface structures bacilli), but also about the participation of other enzymes capable of degrading the compound at the place of carbon bonds in the molecule, it can be used as a source of carbon and phosphorus simultaneously.

**Keywords:** *Bacillus subtilis* IMV B-7023, streptomycin resistant mutant, bacterial cell surface, Fournier Transform Infrared Spectra

1. Utkin D.V., Kuklev V.E., Erohyn D.V., Osina N.A. [Application methods for spectroscopy and identification patogens biological agents]. Especially problems hazardous infection. 2011; 108: 68-71. Russian.
2. Preisner O., Lopes J.A., Guiomar R., Machado J., Menezes C. Fourier transform infrared ( FT-IR) spectroscopy in bacteriology: towards a reference method for bacteria discrimination. Anal. Bioanal. Chem. 2007; 387(5):1739-1748.
3. Sergeychuk M.G. [IF-spectroscopy in identification bacteria of *Bacillus*]. Manuscript candidate degree thesis by speciality biological sciences. Kiev; 1980. 24p.Ukrainian.
4. Rodriguez-Saona L.E., Khambaty F.M., Fry F.S., Dubois J., Calvey E.M. Detection and identification of bacteria in a juice matrix with Fourier transform-near infrared spectroscopy and multivariate analysis. J. Food Prot. 2004; 67(11): 2555-2559.
5. Rebuffo C.A., Schmitt J., Wenning M., von Stetten F., Scherer S. Reliable and rapid identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria species* by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72: 994-1000.

6. *Wenning M., Buchel N., Scherer S.* Species and strain identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks. *J. Biophoton.* 2010; 3(8-9): 493-505.
7. *Vershigora A.E., Averkiev A.A., Paster E.U., Pozur V.K., Kholodnaya L.S.* [IR- spectra of certain substances and chemical fraction of *Staphylococcus*]. *Microbiol. J.* 1981; 43(4): 482-486. Ukrainian.
8. *Roy A.A., Gordienko A.S., Kurdish I.K.* [Growth peculiarities and properties of *Bacillus subtilis* IMV B- 7023 cell surface in the medium with glycerophosphate]. *Microbiol. J.* 2009; 71(2): 63-68. Ukrainian.
9. Patent of Ukraine №54923 A. Strain of bacteria *Bacillus subtilis* for bacterial fertilizer obtaining for plant growing / *I.K. Kurdish, A.O. Roy.*— Published in 2003, Bulletin № 3. Ukrainian.
10. *Kurdish I.K., Roy A.A., Chuiko N.V., Bulavenko L.V., Tsarenko I. J.* Microbial preparation of complex action on plants. Proc. 1-th Intern Sympos. on Biol. Control of Bacterial Plant Discus. Darmstadt Germany, 23-26 October 2005. Helf 1282005, Berichte Biol. Bundesanst fur Forstwirstch 2005.128.
11. *Roi A.A., Yatzenko I.P., Gordienko A.S., Kurdish I.K.* [Features of *Bacillus subtilis* IMV B- 7023 and its streptomycin-resistant strain]. *Applied Microbiology and Biochemistry.* 2011; 47(1): 23-28. Russian.
12. *Roi A.A., Bulavenko L.V., Kurdish I.K.* [New strains of soil bacilli mineralizing organic phosphorus compounds]. *Microbiol. J.* 2001; 63(4). Ukrainian.
13. *Vershinina O.A., Nehotieva H.V., Sharikova M.P.* Alkaline phosphatase of bacilli. Dep. VYNYTY 18.01.1997; (131-B 97):23.
14. *James A.M.* The electrical properties and topochemistry of bacterial cells. *Adv. Colloid. and Interface Sci.* 1982; 15(3/4): 171-211.
15. *Voitenko E.Yu., Puchkovskaya T.A., Bezrodnaya N.A., Ulberg Z.R., Gryshchenko N.I.* Investigation by Infrared Spectroscopy of biocompozite preparations with colloid argentums. *Nanostructure materials research.* 2009; (4): 93-103.
16. *James A.M., Brever V.E.* Non-protein components of the cell surface of *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* 1967; 107(6): 817-821.

Отримано 5.07.2016