

*Е. В. Стабникова, Н. Н. Грегирчак, Т. О. Тараненко,
А. Ю. Нудьга*

Киев, технол. ин-т пищ. пром-сти

АВТОСЕЛЕКЦИЯ НЕЙСТОННЫХ ФОРМ БАКТЕРИЙ

*Показана возможность автоселекции нейстонных форм бактерий *Methylobacterium* sp., *Pseudomonas putida* БС-2, *Alcaligenes paradoxus* БС-1, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, а также смешанной культуры метилотрофов. Несмотря на лабильность гидрофобности поверхности клеток, предложенный метод автоселекции может быть использован для совершенствования свойств ларвицидных биопрепаратов и бактериальных препаратов, усиливающих самоочищение водоемов.*

Ключевые слова: поверхностные свойства клеток, нейстонные формы бактерий

В природных водоемах на границе раздела вода — воздух существует поверхностная пленка, в которой сосредотачиваются органические соединения в концентрациях, в сотни и тысячи раз превышающих их содержание в воде [1, 7, 8]. В поверхностной пленке наблюдается также значительное концентрирование бактерий, за счет чего формируется бактерионейстон, играющий важную роль в процессах самоочищения водоемов [2, 4].

При аэробной детоксикации водоемов целесообразно использовать биопрепараты, представляющие собой нейстонные формы микроорганизмов, активно осуществляющие процессы деструкции органических веществ в насыщенной кислородом пленке природной поверхности раздела жидкость — газ. Селекция нейстонных форм бактерий приведет к повышению активности действия препаратов в природных условиях.

Одной из основных причин, обуславливающих образование бактерионейстона, является гидрофобность поверхности клеток микроорганизмов [7, 8]. Поэтому для получения нейстонных биопрепаратов следует проводить селекцию штаммов, обладающих повышенной гидрофобностью поверхности.

Целью настоящей работы явилась проверка возможности селекции нейстонных форм бактерий с повышенной гидрофобностью поверхности клеток.

Материал и методы. В качестве объектов исследования использовали ценоз метилотрофных бактерий и выделенную из ценоза чистую культуру *Methylobacterium* sp., культуры бактерий *Pseudomonas putida* БС-2 и *Alcaligenes paradoxus* БС-1, способные усваивать в качестве единственного источника углерода диэтиленгликоль, а также ларвицидные бактерии *Bacillus thurlngiensis* var. *israilensis*, хранящиеся в коллекции отдела технологии биосинтеза Института микробиологии и вирусологии АН УССР.

Культуры метанол- и диэтиленгликольусваивающих бактерий выращивали на минеральной среде следующего состава (г/л): NH_4NO_3 — 2,0; MgCl_2 — 0,1; K_2HPO_4 — 3,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 7,0; водопроводная вода — до 1 л. В качестве источника углерода в этой среде использовали соответственно метанол или диэтиленгликоль в количестве 0,5 об. %. *B. thurlngiensis* выращивали на среде, содержащей (в г/л): K_2HPO_4 — 3; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ — 3; NaCl — 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; пептона — 5; глюкозы — 10; водопроводной воды — до 1 л. В обеих средах pH был равен 7,0, температура культивирования — 30 ± 1 °C. Культивирование вели в колбах в условиях качания (240 качаний в 1 мин) и в ферментерах АНКУМ-2; скорость вращения мешалки — 800—1000 об/мин, расход воздуха — 0,5 л/л·мин.

С целью автоселекции нейстонных форм бактерий культуры выращивали в колбах на качалках до достижения стационарной фазы роста: метилотрофные бактерии — в течение 72 ч; бактерии, усваивающие диэтиленгликоль, — 90 ч; *B. thurlngiensis* — 24 ч. Выращенную культуру отстаивали в течение 30 мин, а затем клетки с поверхности культуральной жидкости с помощью пенопластового поплавка или бактериологической петли (техника отбора поверхностных форм микроорганизмов в гидробиологических исследованиях описана в работах Романенко и Norkans [2, 8]) переносили в свежую питательную среду. Изменение гидрофобных свойств клеток бактерий наблюдали в течение 7-кратного пересева культуры.

Для оценки гидрофобности поверхности клеток использовали метод Розенберга [9]: к 4 мл суспензии бактерий добавляли 1 мл гексадекана, встряхивали в течение 7—10 мин и смесь отстаивалась в течение 10 мин. Из 0,01 мл суспензии готовили фиксированный мазок площадью 4 см², окрашивали его фуксином и вели счет бактериальных клеток в 10 полях зрения с помощью микроскопа ЛЮМАМ-112* при увеличении 450 раз. Количество клеток в 1 мл определяли по формуле $N = F \cdot A \cdot n / 100 \cdot f$, где F — площадь мазка, мм²; f — площадь поля зрения, 0,81 мм²; A — разведение; n — среднее количество клеток в поле зрения. О гидрофобности поверхности клеток судили по доле биомассы, перешедшей из суспензии в гексадекан:

$$K_3 = (N_0 - N_n) / N_0,$$

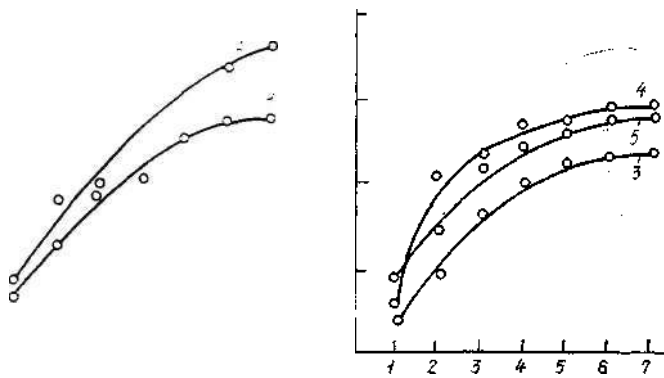
где N_0 и N_n — концентрация клеток в суспензии до и после смешивания ее с гексадеканом.

Нейстонные формы бактерий отсеивали на скошенный МПА и хранили при температуре 5 °C.

Результаты и их обсуждение. Изменение гидрофобности поверхности клеток бактерий в процессе автоселекции нейстонных форм бактериальных культур приведены на рис. 1. Гидрофобность клеток бактерий всех исследуемых культур за 7 пересевов увеличивалась: для *Alcaligenes paradoxus* БС-1 (рис. 1, /) с 0,19 до 0,54; *Pseudomonas putida* БС-2 (рис. 1, 2) — с 0,11 до 0,72; ценоза метилотрофных бактерий (рис. 1, 3) — с 0,12 до 0,44, *Methylobacterium* sp. (рис. 1, 4) — с 0,08 до 0,57, *Bacillus thurlngiensis* (рис. 1, 5) — с 0,16 до 0,54. При этом гидрофобность поверхности клеток быстро возрастала от 1-го до 5-го пересева, а в дальнейшем изменялась незначительно. Исключение состав-

.-ял штамм *P. putida* БС-2, у которого гидрофобность клеточной поверхности продолжала увеличиваться вплоть до 7-го пересева.

Полученную нейстонную форму бактерий *P. putida* БС-2 с показателем гидрофобности клеток 0,72 использовали в качестве посевного материала при периодическом (96 ч выращивания) и непрерывном (72 ч выращивания при скорости разбавления $0,05 \text{ ч}^{-1}$) культивировании. Показатель гидрофобности клеток в конце культивирования составил соответственно 0,67 и 0,70, т. е. наблюдалось сохранение отселекционированного признака. Однако в процессе длительного хранения



та пересевов

Рис. 1.

(3 мес! нейстонные формы метилотрофных культур утрачивали высокую гидрофобность поверхности клеток, и она снижалась для клеток ценоза и чистой культуры *Methylobacterium* sp. ИК с 0,44—0,57 до **0,18**, При повторении процедуры автоселенции гидрофобность поверхности клеток бактерий вновь быстро увеличивалась (рис. 2. / — ценоз метилотрофных бактерий; 2 — то же через 3 мес хранения, 3 — *Methylobacterium* sp. ИК; 4 — то же через 3 мес хранения).

В бактериальных популяциях часто встречается генетически обусловленная гетерогенность по гидрофобности поверхности клеток [5, 6]. Именно наличием этой гетерогенности можно объяснить возрастание среднего значения гидрофобности поверхности клеток при использовании в

качестве посевного материала клеток из поверхностной пленки раздела жидкость — газ. По-видимому, биопленка обогащена генетическими вариантами исследуемых бактериальных культур с повышенной гидрофобностью поверхности клеток. Однако, как показали наши эксперименты, лабильность этого показателя обеспечивает не только быстрое повышение при пассировании, но и снижение при хранении.

Предложенный нами метод автоселекции бактериальных клеток с повышенной гидрофобностью в литературе не описан. Однако известны процессы автоселекции, направленные на применение других свойств поверхности клеток микроорганизмов. Примером может служить автоселекция активно флокулирующего штамма *Kluyveromyces marxianus*

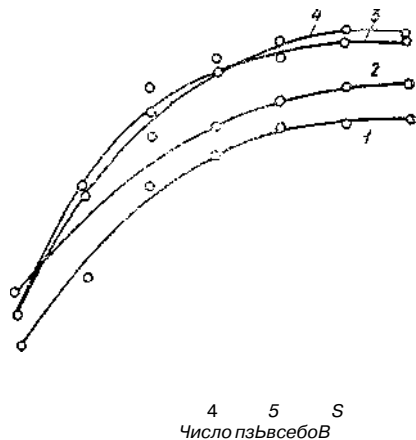


Рис. 2.

[10]. Дрожжи выращивали в периодическом режиме, и клетки из осадка, полученного при центрифугировании культуральной жидкости, использовали для засева свежей питательной среды. Авторы отмечают усиление флокулирующих свойств культуры от пересева к пересеву. Подобные результаты были получены нами при аналогичной автоселекции культуры *Brevibacterium* sp. с повышенной флокуляционной способностью.

Вышеприведенные результаты свидетельствуют о возможности автоселекции нейстонных форм бактерий, которая, несмотря на лабильность свойства гидрофобности поверхности клеток, вероятно, может быть использована для совершенствования ларвицидных биопрепаратов и бактериальных препаратов, усиливающих самоочищение водоемов.

О. В. Стабникова, Н. М. Грегирчак, Т. О. Тараненко, А. Ю. Нудьга
Київ, технол. ін-т харч, пром-сті

АВТОСЕЛЕКЦІЯ НЕЙСТОННИХ ФОРМ БАКТЕРІЙ

Резюме

Показана можливість автоселекції нейстонних форм бактерій *Methylobacterium* sp., *Pseudomonas putida* Бс-2, *Alcaligenes paradoxus* Бс-1, *Bacillus thuringiensis* var. *israilensis*, а також змішаної культури метилотрофів. Незважаючи на лабільність гідрофобності поверхні клітин, запропонований метод автоселекції може бути використаний для удосконалення властивостей ларвицидних біопрепаратів та бактеріальних препаратів, що підсилюють самоочищення водойм.

V. E. Stabnikova, N. N. Gregirchak, T. O. Taranenko, A. Yu. Nudga
Kiev Technological Institute
of Food Industry, Kiev

SELF-BREEDING OF NEUSTON FORMS OF BACTERIA

Summary

Self-breeding of neuston forms of *Methylobacterium* sp., *Pseudomonas putida* BC-2, *Alcaligenes paradoxus* BC-1, *Bacillus thuringiensis* var. *israilensis* bacteria as well as of a mixed culture of methylotrophs is shown possible. In spite of lability of hydrophobicity of the cell surface the suggested method of self-breeding may be used to perfect properties of larvicidal biopreparations and bacterial preparations which intensify self-purification of water bodies.

Key words: surface properties of cells, neuston forms of bacteria

The author's address: E. V. Stabnikova Kiev Technological Institute of Food Industry 68, Vladimirska St., 17, Kiev, 252017, Ukr. SSR

1. Зайцев Ю. П. Морская нейстонология.— Киев : Наук, думка, 1977.— 264 с.
2. Романенко В. И. Микробиологические процессы продукции и деструкции органического вещества во внутренних водоемах.—Л.: Наука, 1985.— 295 с.
3. Стабникова Е. В., Полятевич Е. В., Иванов В. Н. Корреляция между гидрофобностью поверхности дрожжевых клеток и их флотиремостью // Микробиол журн.— 1989.— 51, № 5.—С. 28—31.
4. Цыбань А. Б. Бактерионейстон и бактериопланктон шельфовой области Черного моря.— Киев : Наук, думка, 1970,—274 с.

5. *Fattom A. Shilo M.* Hydrophobisity as an adhesion mechanism of bentic cyanobacteria//Appl. and Environ. Microbiol.—1984.—47, N 1.—P. 135—143.
6. *Hermansson M, Kjelleberg S., Korhonen T., Stenstrom T.* Hydrophobic and electrostatic characterization of surface structures of bacteria and ist relationship to adhesion to an ainvater interface // Arch. Microbiol,—1982.—131, N 4.—P. 308—312
7. *Kjelleberg S.* Mechanism of bacterial adhesion at gas-liquid interfaces//Bacterial adhesion.— New York, London : Plenum press, 1985.— P. 163—194.
8. *Norkans B.* Surface microlayers in aquatic environments//Adv. Microbiol. Ecol.— New York; London : Plenum, press, 1980.—4.—P. 51—85.
9. *Rosenberg M.* Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity // FEMS Microbiol. Lett,—1984.—22, N 3.—P. 289—295.
10. *Pratima B., Argyreos M.* Studied on the flocculation characteristics of *Kluyveromyces mar nanus* [™]Biotechnol. and Bioeng.- 1986.—28, N 2—P. 283—287.

Рецензент И. К. Курдиш
Член редколлегии В. С. Подгорский

Получено 26.10.90