

УДК 579.852.11.083.13

© 1992 г. СТАБНИКОВА Е.В., ГРЕГИРЧАК Н.Н., ИВАНОВ В.Н.

## ВОЗРАСТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КЛЕТОК БАЦИЛЛ С ПОВЕРХНОСТЬЮ РАЗДЕЛА ЖИДКОСТЬ-ГАЗ

Методом проточной цитофлуорометрии изучено наличие возрастной специфичности взаимодействия клеток бактерий с поверхностью раздела жидкость-газ.

Установлено, что взаимодействие бактериальной клетки с поверхностью раздела жидкость-газ зависит от положения клетки в цикле деления и не зависит от положения клетки в цикле репликации ДНК.

Взаимодействие клеток микроорганизмов с поверхностью раздела жидкость-газ осуществляется во всех биотехнологических процессах и играет большую роль в функционировании микробных экосистем. Поэтому исследование биологической специфичности этого взаимодействия может помочь в изучении экологии микроорганизмов и в совершенствовании биотехнологий [5].

Например, выявление возрастной специфичности взаимодействия клеток дрожжей с поверхностью раздела жидкость-газ в процессе флотации (т.е. в процессе удаления клеток из суспензии, продуваемой газом, в пену) позволило предложить метод синхронизации размножения дрожжевых культур [2]. Наиболее быстро флотируются клетки дрожжей в М-фазе клеточного цикла, поскольку гидрофобность их поверхности достигает максимального значения по сравнению с клетками других фаз клеточного цикла [1–3].

По-видимому, взаимодействие клеток бактерий с поверхностью раздела жидкость-газ также связано с возрастной специфичностью бактериальных клеток, поскольку выделяя из бактериальной суспензии фракцию быстрофлотирующихся клеток и используя ее в качестве посевного материала, можно обеспечить синхронизацию размножения бактерий [4]. Однако неясно было, обусловлен ли этот эффект изменением гидрофобности<sup>TM</sup> поверхности клеток в ходе цикла деления клетки или в ходе цикла репликации ДНК.

Цель данной работы - анализ связи между флотируемостью и гидрофобностью бактериальной клетки и ее положением в клеточном цикле.

## Материалы и методы исследования

В работе использовали культуры *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus licheniformis* из коллекции бацилл Института микробиологии и вирусологии АН Украины.

Бактерии культивировали в ферментере АНКУМ-2 (СКВ БП РАН, Пущино) с рабочим объемом 1 л при 30°, рН 7,0. Бациллы выращивали на средах следующего состава (г/л): глюкоза - 10,0; Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> - 3,0; KH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub> - 3,0; NaCl - 2,0;

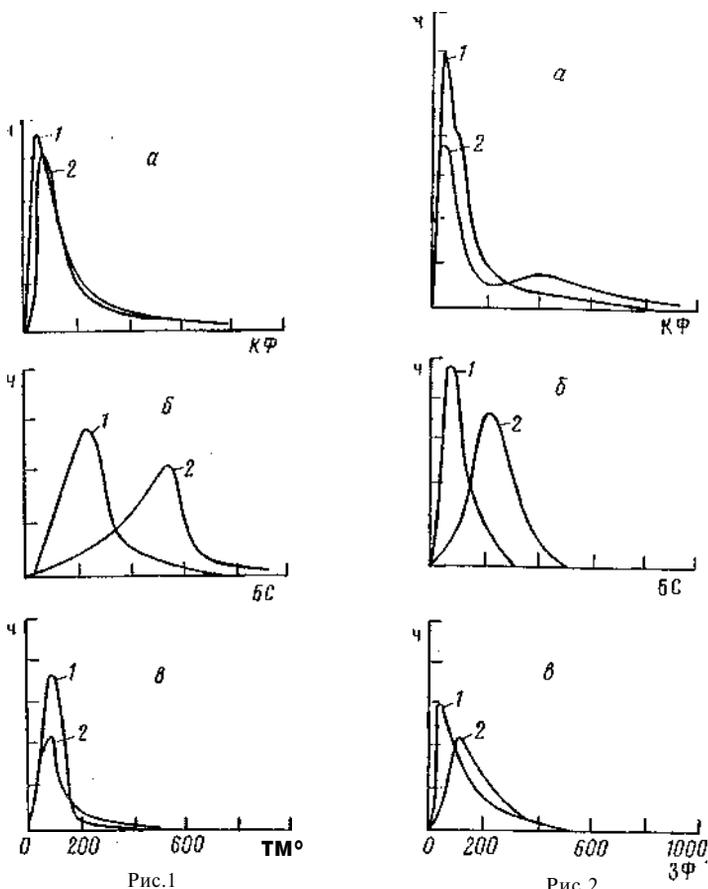


Рис.1

Рис.2

Рис. 1. Распределение клеток *B. thuringiensis* по содержанию ДНК (а), размерам (б), содержанию белка (в). 1 - клетки фракции быстрофлотирующихся клеток; 2 - клетки исходной популяции. По оси абсцисс: КФ - интенсивность красной флуоресценции клеток, БС - интенсивность бокового светорассеяния, ЗФ - интенсивность зеленой флуоресценции в условных единицах; по оси ординат: ч - относительная частота встречаемости клеток

Рис. 2. Распределение клеток *B. licheniformis* по содержанию ДНК (а), размерам (б) и содержанию белка (в). Остальные обозначения, как на рис. 1

MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O - 0,1; пептон - 5,0 (для *B. thuringiensis*) \ сахароза - 6,5; KH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub> - 1,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 3,5; NaCl - 0,06; NH<sub>4</sub>Cl - 1,0; KCl - 0,035; Na<sub>2</sub>S0<sub>4</sub> - 0,3; MgCl<sub>2</sub> • 5H<sub>2</sub>O - 4,26 (для *B. licheniformis*), этанол - 0,5; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> - 2 0; MgCl<sub>2</sub> - 0,1; KH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub> - 3,0; K<sub>2</sub>HPC4 - 7,0 (для *B. megaterium*).

Для синхронизации культур использовали метод флотации [2, 3], который обеспечивал синхронизацию с индексом от 0,55 до 0,70. Метод основан на продувании суспензии клеток воздухом и использовании фракции пены с наиболее быстро флотирующимися клетками, составляющими около 5—6% от общего числа клеток в суспензии, в качестве посевного материала. Отбор проб при синхронном культивировании проводили каждые 30 мин в течение 4 - 6 ч. В образцах определяли концентрацию клеток путем счета клеток на фиксированных препаратах, а количество ДНК в пробе определяли спектрофотометрическим методом [7].

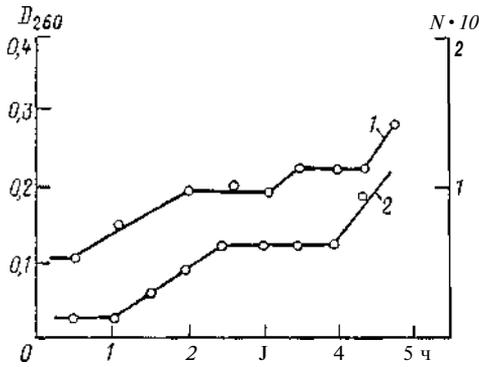


Рис. 3

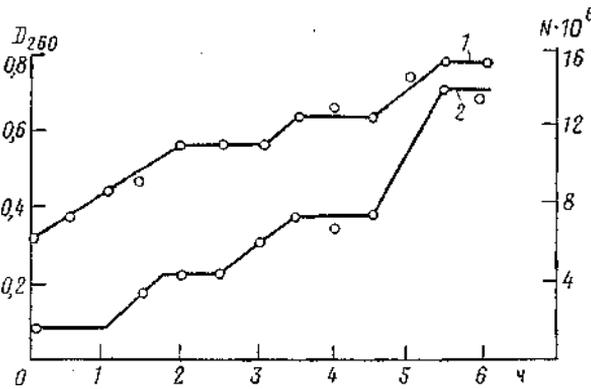


Рис.4

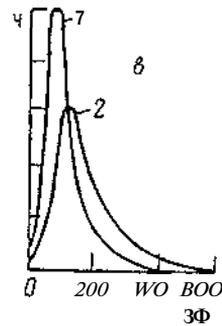
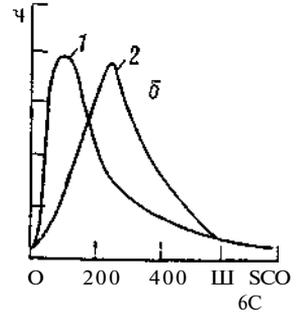
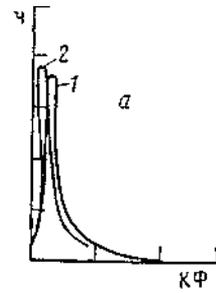


Рис.5

Рис. 3. Изменение содержания ДНК в культуре (1) и концентрации клеток (2) при синхронном культивировании *B. megaterium*.  $D_{260}$  - концентрация ДНК (в единицах оптической плотности)

Рис. 4. Изменение содержания ДНК в культуре (1) и концентрации клеток\*(2) при синхронном культивировании *B. thuringiensis*.  $D_{260}$  - концентрация ДНК (в единицах оптической плотности)

Рис. 5. Распределение клеток *B. megaterium* по содержанию ДНК (а), размерам (б) и содержанию белка (в). 1 - фракция клеток, не перешедших в гексадекан; 2 - клетки исходной популяции. Остальные обозначения, как на рис.1

**Гидрофобные» поверхности клеток** бацилл оценивали по количеству клеток, перешедших из бактериальной суспензии в гексадекан при смешивании их объемов в соотношении 4:1 в течение 10 мин.

Цитофлуорометрический анализ распределения клеток по содержанию ДНК проводили с помощью проточного цитофлуориметра FACStar Plus («Becton Dickinson») по известному методу [9]. Флуоресценция окрашенных клеток возбуждалась аргонным лазером с длиной волны 488 нм. Содержание ДНК определяли, окрашивая

фиксируемые в этаноле клетки раствором этидиум бромид («Berva») и измеряя красную флуоресценцию 20 тыс. клеток. Распределение клеток по содержанию белка получали, окрашивая их раствором флуоресцеинизотиоцианата («Serva») и измеряя интенсивность зеленой флуоресценции 20 тыс. клеток. Распределение клеток по их относительному размеру получали, измеряя интенсивность бокового светорассеяния.

Бактериальную суспензию для анализа отбирали из экспоненциальной фазы роста (время культивирования 12 ч), чтобы исключить эффект влияния присутствия спор на получаемые результаты.

Опыты проводили в пяти-шести повторностях. На рисунках представлены типичные кривые распределения клеток бактерий по содержанию ДНК, белка и размерам.

## Результаты

Для исходных суспензий клеток *B. thuringiensis* и *B. licheniformis* и фракции быстрофлотирующихся клеток этих суспензий были получены распределения клеток по содержанию в них ДНК (по интенсивности красной флуоресценции), по содержанию в клетках белка (по интенсивности зеленой флуоресценции клеток) и по размерам клеток (по интенсивности бокового рассеяния света). Для обеих бактериальных культур получены одинаковые результаты. Распределение клеток исходной популяции и фракции быстрофлотирующихся клеток по содержанию ДНК примерно одинаково (рис. 1, а и 2, а). Однако быстрофлотирующиеся клетки имеют меньшие размеры (рис. 1, б и 2, б) и содержат меньше белка (рис. 1, в и 2, в), чем клетки исходной (целостной) популяции.

Использование фракций быстрофлотирующихся клеток бацилл в качестве посевного материала обуславливает синхронизацию размножения (деления) клеток и синхронизацию репликации ДНК в бактериальных клетках (рис. 3,4).

Для анализа связи гидрофобной поверхности клетки с ее положением в клеточном цикле проводили обработку суспензии клеток *B. megaterium* из экспоненциальной фазы периодической культуры гексадеканом и анализировали распределение клеток исходной популяции и фракции клеток, не перешедших в гексадекан, по содержанию ДНК и по размерам (рис. 5). Распределения по содержанию ДНК примерно одинаковы. Однако клетки, оставшиеся в суспензии после смешения образца с гексадеканом, более крупные, чем клетки исходной популяции.

## Обсуждение

Основной результат наших исследований - установление существования возрастной специфичности взаимодействия клеток бактерий с поверхностью раздела жидкость—газ. Наиболее быстрофлотирующиеся клетки и клетки с наиболее гидрофобной поверхностью - это мелкие клетки, находящиеся в начале клеточного цикла (недавно разделившиеся). По данным проточной цитофлуорометрии флотируемость клеток и гидрофобность поверхности клеток не связана с положением клетки в цикле репликации хромосомной ДНК (с содержанием ДНК в клетке). То, что взаимодействие бактериальной клетки с поверхностью раздела жидкость-газ зависит от положения клетки в цикле репликации ДНК, можно объяснить тем, что цикл деления и цикл репликации ДНК у прокариот, в отличие от эукариот, не синхронизованы между собой [1]. Однако это отсутствие синхронизации нельзя абсолютизировать и в ряде моделей клеточного цикла бактерий учитывается определенная временная корреляция между циклом деления и циклом репликации ДНК [6, 8]. По-видимому, такая корреляция проявляется в наших экспериментах в виде синхронизации деления клеток и репликации ДНК при использовании фракции быстрофлотирующихся клеток в качестве посевного материала.

Исходя из данных наших экспериментов, можно предположить, что в верхнем слое пены в ферментерах будут преобладать мелкие клетки бактерий, находящиеся в начале цикла деления. Это целесообразно учитывать при проведении биотехнологических процессов. Аналогичные предположения можно высказать и в отношении бактерионеистона - микроорганизмов поверхностной пленки природных водоемов. Различие в возрастной структуре клеток бактерионеистона может играть важную роль в экологии бактерий, например в суточной вертикальной миграции или суточных колебаниях активности жизнедеятельности.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Иванов В.Н., Угодников Г.А.* Клеточный цикл микроорганизмов и гетерогенность их популяций. Киев: Наук, думка, 1984. 280 с.
2. *Иванов В.Н.* // Микробиол. журн. 1985. Т. 47. № 4. С. 90.
3. *Стабникова Е.В., Полятевич Е.В., Пиндрус А.А., Иванов В.Н.* // Микробиол. журн. 1990. Т. 52. № 2. С. 46.
4. *Стабникова Е.В., Цимберг Е.А., Грегирчак Н.Н.* // Микробиология. 1990. Т. 59. Вып. 2. С. 276.
5. *Стабникова Е.В., Гордйенко А.С., Ксенофонтов Б.С. и др.* Взаимодействие клеток с поверхностью раздела жидкость-газ. Киев: Наук, думка, 1992. 196 с
6. *D'Ari R., Maguin E., Boulou P. et al.* // Res. Microbiol. 1990. V. 141. N 1 P 9
7. *Bagi G., Csatorday R., Farcus G.* // Arch. Microbiol. 1979. V. 123. P. 109
8. *Cooper S.* // Res. Microbiol. 1990. V. 141. N 1. P. 17.
9. *Hunter K.-J., Eipel H.E.* // Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol, and Serol. 1978. V. 44. P. 269.

Киевским технологическим институт  
пищевой промышленности

Поступила в редакцию  
10.IV.1991

Институт микробиологии и вирусологии  
им. Д.К. Заболотного АН Украины

Рецензент Д Г Звягинцев

STABNIKOVA EV., GREGIRCHAK N.N., IVANOV V.N.

#### AGE SPECIFICITY OF THE INTERACTION OF THE BACILLI CELLS WITH LIQUID-GAS INTERFACE

The age specificity of the bacilli cells with liquid-gas interface was studied using flow cytofluorometry.

This interactions is dependent on the position of the cell in the division cycle and not on the position of the cell in the DNA replication cycle.