

Л. В. Куис, магистрант; Р. М. Маркевич, доцент

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РОСТ БАКТЕРИЙ *BACILLUS MUCILAGINOSUS*

Cultivation *Bacillus mucilaginosus* on six different environments was carried out. Influence of structure of a nutrient medium on growth of culture and structure cultural liquids was studied. The structures of environments allowing at cultivation *Bacillus mucilaginosus* to receive an acid and polysaccharides are picked up to study their influence on quality indicators clays.

Начиная с 80-х годов изучается разрушение силикатов под воздействием бактерий *Bacillus mucilaginosus* и проводятся исследования по использованию этих бактерий для повышения качества сырья и технологических смесей при производстве керамических изделий [1, 2].

К настоящему времени большинство исследователей объясняют деструкцию силикатов воздействием продуктов метаболизма микроорганизмов (ферментов, органических и неорганических кислот, полисахаридов). Действие одних продуктов приводит к диспергированию частиц, повышению доли тонкодисперсной фракции и, в определенных пределах, к повышению пластичности глины. Другие продукты сильнее проявляют склеивающее действие, способствуют переходу большего количества влаги в связанное состояние, что приводит к снижению коэффициента чувствительности образцов к сушке.

Вместе с тем до настоящего времени отсутствуют точные сведения о характере метаболитов, благодаря которым осуществляется диспергация минералов. Предполагается, что наиболее существенное влияние могут оказывать ди-, три- и поликарбоновые кислоты, окси-, кето- и аминокислоты, гумусовые кислоты. Относительно экзополисахаридов имеется сообщение [3], что это могут быть полисахариды, содержащие галактозу, глюкозу, маннозу (в молярном соотношении 10 : 19 : 13) и в небольшом количестве (0,16%) – аминоксахара. Отмечается, что на состав экзополисахаридов влияют условия выращивания микроорганизмов.

Проведенными нами исследованиями было показано, что микробиологическая обработка глин белорусских месторождений приводит к существенному изменению их качественных показателей: пластичности, коэффициента чувствительности к сушке, воздушной линейной усадки [4]. Культуральная жидкость, которую мы использовали для обработки глин, получена при выращивании *Bacillus mucilaginosus* на синтетической среде с сахарозой. Она имела значение pH 4,0 и содержала полисахариды.

Цель настоящего этапа исследований заключалась в установлении влияния состава питательной среды на рост *Bacillus mucilaginosus* и накопление продуктов метаболизма.

В последнее время появился ряд патентов по применению *Bacillus mucilaginosus* для получения бактериальных удобрений, синтеза полисахаридов, создания на их основе биосорбентов. Бактерии эти в некотором роде уникальны, их рост и накопление метаболитов зависит от условий, прежде всего от состава питательной среды.

В табл. 1 приведен состав сред, применяемых для выращивания *Bacillus mucilaginosus*.

Таблица 1
Состав сред для выращивания
Bacillus mucilaginosus

Номер и наименование среды	Состав среды	
	Название компонентов	Содержание компонентов, г/л
Среда № 1	Сахароза	5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
	K ₂ HPO ₄	0,2
	MgSO ₄	0,2
	NaCl	0,1
	K ₂ SO ₄	0,1
Среда Эшби (№ 2)	Сахароза	20
	K ₂ HPO ₄	0,2
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2
	NaCl	0,2
	K ₂ SO ₄	0,1
	CaCO ₃	0,1
Среда Эшби (без мела) (№ 3)	Сахароза	20
	K ₂ HPO ₄	0,2
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2
	NaCl	0,2
	K ₂ SO ₄	0,1
Среда № 4	Сахароза	20
	NaNO ₃	0,5
	K ₂ HPO ₄	0,2
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2
	NaCl	0,2
	K ₂ SO ₄	0,1
	CaCO ₃	0,1
Среда № 5	Сахароза	20
	NaNO ₃	0,5
	K ₂ HPO ₄	0,2
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2
	NaCl	0,2
	K ₂ SO ₄	0,1
Картофельный отвар (№ 6)	200 г картофеля на 1 л воды	

На среде № 1, как отмечалось выше, происходит накопление и кислот, и полисахаридов. Из литературных данных известно, что *Bacillus mucilaginosus* хорошо растет на агаризованной среде Эшби, образуя слизистые крупные колонии. Это безазотистая среда (№ 2), на которой, согласно литературным данным [5], споры не образуются. Мы сравнили рост культуры в отсутствии азота и при добавлении нитрата натрия (среда № 4). Поскольку присутствие мела мешает фиксировать образование кислот, использовали два варианта сред: с мелом и без него (соответственно среды № 2 и 3, № 4 и 5). И, наконец, использовали натуральную среду – картофельный отвар. В синтетических средах устанавливали исходное значение pH 7,0, картофельный отвар имел pH 8,2.

Бактерии наращивали в пробирках на агаризованной среде, затем в качалочных колбах при температуре 30°C в течение 2 сут. По окончании культивирования определяли pH культуральной жидкости, экстинкцию при длине волны 500 нм и проводили микроскопирование. Содержание полисахаридов определяли в тех культуральных жидкостях, которые имели высокое значение экстинкции. Для этого клетки отделяли центрифугированием при 5000 об/мин в течение 20 мин, а охлажденные до температуры 10°C супернатант и этиловый спирт смешивали в соотношении 1 : 3, выдерживали в холодильнике для формирования осадка, жидкость декантировали, осадок высушивали до постоянной массы.

На синтетической агаризованной среде № 1 *Bacillus mucilaginosus* образует мелкие полупрозрачные колонии. Колонии на среде Эшби выпуклые, полупрозрачные, слизистые, с ровными краями, вязкой консистенции, диаметром до 0,5 см. На картофельном агаре формируются светло-серые, гладкие, с ровным краем, влажные, блестящие колонии, диаметром до 0,4 см.

В табл. 2 представлены результаты анализа культуральных жидкостей, полученных при выращивании *Bacillus mucilaginosus* на различных средах.

Активное образование кислот происходило на синтетических средах: № 1 и среде Эшби. Значение pH культуральной жидкости на этих средах составляет 4,1–4,5, в то время как при выращивании бактерий на картофельном отваре наблюдается подщелачивание (pH 8,8).

В культуральной жидкости, полученной на среде № 1, клетки окружены капсулой, число вегетативных клеток невелико, в большом количестве присутствуют споры. К концу вторых суток наблюдалось образование конгломератов клеток, их слипание, появление хлопьев в культуральной жидкости. Аналогичные данные получили авторы [6] при изучении роста *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. Эти бактерии могут расти и в миксотрофных условиях (в присут-

ствии пирита и органических веществ), и в гетеротрофных. Однако увеличение образования капсульного материала авторы считают защитной реакцией клеток на не вполне благоприятные условия роста – отсутствие в среде минерального источника энергии.

В наших условиях состав среды № 1 отличается от состава сред № 2 и 4 количеством сахарозы и источником азота: в среде № 2 он отсутствует, в среде № 4 это нитрат натрия.

При выращивании на среде Эшби с нитратом натрия (среды № 4 и 5) получается вязкая, тягучая культуральная жидкость, имеющая высокое значение экстинкции. В поле зрения микроскопа – большое количество клеток, содержание спор незначительное. Клетки неподвижные, палочковидные с округлыми концами, образуют скопления. Однако визуально в культуральной жидкости хлопья не обнаруживаются. При добавлении спирта к супернатанту формируется взвешенный, связанный в единую структуру осадок. Содержание полисахаридов самое высокое (4,2 г/л) на среде без мела. На этой среде также происходит интенсивное накопление кислот (значение pH 4,1).

Таблица 2
Результаты анализа культуральной жидкости, полученной при выращивании *Bacillus mucilaginosus* на средах различного состава

№ среды	pH культуральной жидкости	Экстинкция E ₅₀₀	Концентрация полисахарида, г/л
1	4,2	0,308	–
2	7,5	0,126	–
3	4,5	0,135	–
4	7,2	1,231	3,1
5	4,1	1,604	4,2
6	8,8	1,837	1,3

На безазотистой среде Эшби рост самый слабый, значение экстинкции невысокое, полисахарида образуется мало. Вместе с тем и в этих условиях происходит снижение pH культуральной жидкости до 4,5.

Таким образом, при выращивании *Bacillus mucilaginosus* на всех синтетических средах примерно в равной степени происходит образование кислот, которые нейтрализуются в средах с мелом.

Накопление полисахаридов происходит в разных количествах в зависимости от состава среды. Если считать синтез экзополисахаридов, как отмечалось выше, защитной реакцией клеток на неблагоприятные для них условия, то наименее благоприятным оказывается присут-

ствии в среде нитратного азота. Авторы [7], характеризуя *Bacillus mucilaginosus*, указывают, что эти бактерии могут расти на средах без азота, но не используют нитраты как источник азота. В среде № 1 полисахарида образуется больше, чем в среде Эшби.

Несколько иначе идет наращивание бактерий на картофельном отваре. При микроскопировании практически не обнаружены споры, наблюдается большое количество палочковидных клеток, образующих скопления. Образование кислот не происходит, наблюдается даже некоторое подщелачивание среды (рН возрастает с 8,2 до 8,8).

Картофельный отвар изначально содержит полисахарид – крахмал. Поэтому по приведенной методике определили исходное содержание полисахарида. Прирост содержания полисахарида после культивирования составил 1,3 г/л. В данном случае осадок имеет иной характер, чем образующийся на среде № 4. Он хлопьеобразный, хорошо осаждается.

Разный характер осадка, вероятно, свидетельствует о его различном составе. Выше отмечалось, что при гидролизе экзополисахаридов, синтезируемых *Bacillus mucilaginosus*, образуются галактоза, глюкоза, манноза и аминокислота; по данным других авторов, в состав экзополисахаридов входят только глюкоза и манноза. Отсутствуют работы по анализу состава кислот.

Таким образом, подобраны составы сред, позволяющие при культивировании *Bacillus mucilaginosus* получить кислоты и полисахариды, чтобы исследовать их состав и изучить их воздействие на качественные показатели глин. Для накопления полисахаридов может быть рекомендован картофельный отвар. Среда № 1 может быть использована для установления влияния кислот, поскольку полисахаридов на этой среде образуется значительно меньше. А среда Эшби с нитратом азота по-

зволяет получать и кислоты, и полисахариды и изучать их воздействие при совместном присутствии.

Литература

1. Белканова Н. П., Каравайко Г. И., Авакян З. А. Разрушение силоксанной связи кварца *Bacillus mucilaginosus* // Микробиология. – 1985. – № 1. – С. 27–30.

2. Власов А. С. Биологические методы обогащения минерального сырья и технологических смесей при производстве керамики // Химия и технология силикатных и тугоплавких неметаллических материалов. – Л., 1989. – С. 155–165.

3. Косенко Л. В., Захарова И. Я., Мальцева Н. Н., Иваницкая Л. М. Моносахаридный состав экзополисахаридов у олиготрофных бактерий // Микробиология. – 1977. – № 6. – С. 1039–1043.

4. Маркевич Р. М., Дятлова Е. М., Какоско Е. С., Куис Л. В. Влияние условий микробиологической обработки глинистого сырья Беларуси на его качественные характеристики // Материалы. Технологии. Инструменты. – 2005. – Т. 10. – № 4. – С. 86–89.

5. Щелоболдина Е. С. и др. Описание нового вида слизиобразующих бактерий *Bacillus edaphicus sp. nov.* и подтверждение таксономического статуса *Bacillus mucilaginosus* (Авакян с соавт. 1986) с использованием данных фенотипического и генотипического анализов // Микробиология. – 1997. – № 6. – С. 813–822.

6. Сеньюшкин А. А., Северина Л. О., Митюшина Л. Л. Образование полисахаридной капсулы *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* в олиготрофных и миксотрофных условиях // Микробиология. – 1997, – Т. 66. – № 4. – С. 455–461.

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