

## Эффективность культивирования бактерий рода *Paenibacillus mucilaginosus* на питательной среде на основе сахарозы

**З.Т. Ха**, coldwind.91@mail.ru

д-р техн. наук **А.В. Канарский**, alb46@mail.ru

канд. техн. наук **З.А. Канарская**, zosya\_kanarskaya@mail.ru

Казанский национальный исследовательский технологический университет  
420015, Россия, Республика Татарстан, Казань, ул. Толстова, 8

канд. биол. наук **А.В. Щербаков**, microbe-club@inbox.ru

канд. с.-х. наук **Е.Н. Щербакова**, alonagonchar@mail.ru

ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии  
196608, Россия, Санкт-Петербург, шоссе Подбельского, 3

Силикатные бактерии или *Paenibacillus mucilaginosus* являются одним из перспективных почвенных микроорганизмов для получения биопрепаратов в качестве микробиологических удобрений, стимулирующих рост растений. Биопрепараты *P. mucilaginosus* рекомендуется использовать в различных областях в качестве биосорбента для очистки сточных вод и в виде кормовых добавок как стимулирующие в животноводстве. Определяли эффективность культивирования штаммов бактерий *P. mucilaginosus* на питательной среде из сахарозы. В работе использовали 6 штаммов бактерий *P. mucilaginosus*: 560; 563; 567; 568; 572; 574, предоставленных для исследований ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (Санкт-Петербург). Они культивировались на минеральной питательной среде Александрова с использованием сахарозы в качестве источника углерода. Установлено, что при культивировании штаммов бактерий *P. mucilaginosus* на питательной среде из сахарозы наблюдается двойной цикл роста (кроме штамма 568). При этом эти бактерии обладают  $\beta$ -фруктофуранозидазной и каталазной активностью, фиксируют азот из воздуха, продуцируют индол-3-уксусные кислоты. Самым продуктивным штаммом бактерий *P. mucilaginosus* является штамм 574. Изучено влияние концентрации хлорида натрия и температуры на рост бактерий *P. mucilaginosus*. Показано, что штамм 568 бактерий *P. mucilaginosus* обладает умеренно галофильными свойствами при мезофильных параметрах температуры культивирования. Кроме этого, при культивировании бактерии *P. mucilaginosus* на питательной среде из сахарозы синтезируют экзополисахариды, максимальный выход которых достигается через 48 ч. Дальнейшее культивирование бактерий приводит к деструкции экзополисахаридов гликолитическими ферментами, которые синтезируются бактериями *P. mucilaginosus*.

**Ключевые слова:** сахароза; *Paenibacillus mucilaginosus*; культивирование; кинетические характеристики роста; продукты метаболизма.

DOI: 10.17586/2310-1164-2019-12-3-62-72

## The efficiency of *Paenibacillus mucilaginosus* bacteria cultivation on nutrient medium based on sucrose

**Dung T. Ha**, coldwind.91@mail.ru

D. Sc. **Albert V. Kanarsky**, alb46@mail.ru

Ph. D. **Zocia A. Kanarskaya**, zosya\_kanarskaya@mail.ru

Kazan National Research Technological University  
8, Tolstova str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420015, Russia

Ph. D. **Andrei V. Shcherbakov**, microbe-club@inbox.ru

Ph. D. **Elena N. Shcherbakova**, alonagonchar@mail.ru

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology  
3, Podbelsky ave., St. Petersburg, 196608, Russian Federation

Silicate bacteria or *Paenibacillus mucilaginosus* are one of the most perspective microorganisms in soil for obtaining biological products as microbiological fertilizers stimulating plant growth. Biological products of *P. mucilaginosus* are recommended for use in various fields, as a biosorbent for wastewater treatment, and also in the form of feed additives as stimulating in animal husbandry. The aim of the study is to determine the efficiency of cultivation of *P. mucilaginosus* bacteria strains on nutrient medium from sucrose. Six strains of *P. mucilaginosus* bacteria were used in this study: 560, 563, 567, 568, 572, and 574.

provided for research by All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology (St. Petersburg). They were cultivated on the Alexandrov's mineral nutrient medium using sucrose as a carbon source. It was established that the cultivation of *mucilaginosus* bacteria strains on nutrient medium from sucrose demonstrates a double growth cycle (except for strain 568). Moreover, these bacteria have  $\beta$ -fructofuranosidase and catalase activity, fix nitrogen from the air, and produce indole-3-acetic acid. The most productive strain of *P. mucilaginosus* bacteria is strain 574. The effect of sodium chloride concentration and temperature on the growth of *P. mucilaginosus* bacteria is studied. The strain 568 of *P. mucilaginosus* bacteria is shown to have moderately halophilic properties with mesophilic cultivation temperature parameters. In addition, during the cultivation on a nutrient medium from sucrose *P. mucilaginosus* bacteria synthesize exopolysaccharides, the maximum yield of which is reached after 48 hours. Further cultivation of bacteria results in the destruction of exopolysaccharides by glycolytic enzymes, which are synthesized by *P. mucilaginosus* bacteria.

**Keywords:** sucrose; *Paenibacillus mucilaginosus*; cultivation; growth kinetic characteristics; metabolic products.

## Введение

В настоящее время применение бактериальных препаратов для повышения плодородия почвы является одним из приемов агротехнологии, альтернативной возрастающему использованию минеральных удобрений. Это особенно актуально в условиях необходимости экологической безопасности.

Бактерии рода *Paenibacillus* были выделены из различных источников: организма человека, животных, растений и окружающих сред. Большинство из них находятся в почве, часто связаны с корнями растений: эти ризобактерии способствуют росту растений и могут быть использованы в сельском хозяйстве.

Типичным видом бактерий *Paenibacillus*, выделенным из почвы является *Paenibacillus mucilaginosus* (ранее *Bacillus mucilaginosus*), которая с 1990 года широко используется в сельском хозяйстве в качестве микробиологического удобрения [1–3]. Эти бактерии способны разлагать нерастворимые минералы почвы с образованием ионов калия и водорастворимого фосфора необходимых для растений [4–6]. *P. mucilaginosus* соответственно в природе принимают участие в биогеохимическом цикле калия, фосфора и других элементов [7–9].

*P. mucilaginosus* используется в биологических удобрениях как за способность к минерализации фосфора и калия, так и за способность к азотфиксации [10]. Некоторые штаммы *P. mucilaginosus* имеют антагонистический характер к микроорганизмам, угнетающим рост растений [11–13], также способствуют увеличению урожайности растений [14].

Специфическими характеристиками ризобактерий, включая *P. mucilaginosus*, является способность синтеза ауксинов – гормонов, которые являются важнейшими регуляторами экспрессии и развития генов на протяжении всей жизни растения, участвуя в делении клеток, удлинении, развитии плодов и старении. Существует несколько классов ауксинов, однако первым идентифицированным и наиболее распространенным в природе является индол-3-уксусная кислота (ИУК). Известно, что многие ризобактерии эффективно продуцируют ИУК в стационарной фазе роста [15, 16].

*P. mucilaginosus* является типичной силикатной бактерией, продолжительно используется не только в качестве биоудобрения в сельском хозяйстве, но как установлено, может эффективно использоваться в области биовыщелачивания и очистки сточных вод. При очистке сточных вод бактерии *P. mucilaginosus* применяются в качестве биофлоккулянта неорганических и органических взвешенных твердых частиц, а также как биосорбента тяжелых металлов в сточных водах [17, 18].

Следует отметить, что многие виды *Paenibacillus* производят антимикробные соединения, которые полезны в медицине, и многие из них синтезируют ферменты, которые могут быть использованы для биоремедиации или для производства ценных химических веществ [19, 20].

Все вышеупомянутые характеристики и свойства *P. mucilaginosus* обосновывают необходимость выделения чистых высокоэффективных штаммов этой культуры.

Целью данной работы является определение эффективности культивирования штаммов бактерий *P. mucilaginosus* на питательной среде из сахарозы.

Эффективность культивирования определялась по следующим признакам: морфологические, кинетические характеристики роста, способность фиксировать азот, способность синтезировать

фитогармон индол – 3-уксусная кислота, ферменты  $\beta$ -фруктофуранозидаза и каталаза, а также внеклеточные полисахариды.

### Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись 6 штаммов бактерий *P. mucilaginosus*: 560; 563; 567; 568; 572; 574, предоставленных Ведомственной коллекцией непатогенных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург).

Музейные культуры бактерий *P. mucilaginosus* хранились на плотной питательной среде Эшби без азота состава, описанного в работе [12]. На данной питательной среде культуры хранились до 6 месяцев.

Глубинное культивирование культуры осуществляли на жидкой питательной среде Александрова следующего состава (%): сахароза – 1; NaCl – 0,02;  $K_2HPO_4$  – 0,2;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,05;  $CaCO_3$  – 0,01;  $NH_4NO_3$  – 0,02. Выращивание проводилось в колбах Эрленмейера объемом 100 мл при температуре  $30 \pm 1^\circ C$  и непрерывном перемешивании со скоростью 220 об/мин на шейкере инкубатора ES-20 в течение 3 суток. Инокулят засеивали из расчета 10% от объема питательной среды.

Экспресс метод для определения количества бактериальных клеток в культуральной жидкости проводили по калибровочному графику в зависимости от оптической плотности среды. Оптическую плотность определяли на фотоэлектрическом колориметре при длине волны 540 нм ( $OD_{540}$ ) в кюветах шириной 5 мм. Подсчет выросших колоний проводили по методу Коха на чашки Петри с десятикратным разведением.

Клетки окрашивали по Грамму, используя стандартную методику [21]. Микроскопирование клеток проводили на видеомикроскопе MC 100 (LCD PC) после 72 ч инкубирования на уплотненных средах Александрова с агаром при температуре  $37 \pm 1^\circ C$ . Размеры бактериальных клеток определялись с использованием программы Fiji. При этом 10  $\mu m$  соответствовали 60 пиксель. Условно принято, что клетка бактерий является цилиндром и, исходя из этого, рассчитывался объем клетки [22].

Способность синтезировать бактериями фермент каталаза качественно проверяли методом, описанным в работе [23]. На чашках Петри с агаром, наносили каплю 10% раствора пероксида на колонии бактерий. Визуально наблюдали выделение  $O_2$  в виде газообразных пузырьков, что подтверждало каталитическую активность бактерий.

Удельная скорость роста, время генерации и выход бактерий рассчитывали согласно рекомендациям в методике [24].

Водородный показатель в культуральной жидкости определяли потенциометрически на рН-метре 150 МИ. Вязкость культуральной жидкости определяли на вискозиметре Vibro SV-10A.

По окончании культивирования, биомассу бактерий от культуральной жидкости отделяли центрифугированием при 15 000 об/мин и температуре  $10 \pm 1^\circ C$  в течение 15 мин. Биомассу бактерий определяли гравиметрическим методом после высушивания инфракрасным способом на влагомере МХ-50. Избыточная сахароза определялись ферментативным методом, описанным в работе [25] при температуре  $25 \pm 1^\circ C$ . Оптическая плотность супернатанта по глюкозе, определялась фотометрически при длине волны 365 нм и ширине кюветы 3 мм. Количество экзополисахаридов определяли по количеству редуцирующих веществ, образующихся при их гидролизе соляной кислотой концентрацией 2 н при кипячении в течение 30 мин на водяной бане.

$\beta$ -фруктофуранозидазная активность бактерий определялась по скорости ферментативной реакции гидролиза сахарозы, которую устанавливали по количеству образовавшегося инверта в реакционной жидкости [26]. Активность  $\beta$ -фруктофуранозидазы определяли с использованием 3,5-динитросалициловой кислоты (ДНСК-реагент). К 0,12 см<sup>3</sup> исследуемой пробы добавляли 1,2 см<sup>3</sup> раствора сахарозы концентрацией 1% (с учетом влажности) и помещали в термостат при температуре  $30^\circ C$  в течение 60 мин, затем добавляли 0,6 см<sup>3</sup> ДНСК. В контрольный образец 1,2 см<sup>3</sup> раствора сахарозы концентрацией 1% и добавляли 0,6 см<sup>3</sup> ДНСК и затем добавляли 0,12 см<sup>3</sup> исследуемой пробы и сразу помещали в водную баню. Выдерживали все пробы 10 минут при  $100^\circ C$ , затем 10 мин при  $0^\circ C$ . Далее добавляли во все пробы по 6 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и измеряли оптическую плотность при 540 нм при ширине кюветы 5 мм. Концентрация редуцирующих веществ (РВ) в каждом образце определялась по калибровочному графику стандартного раствора глюкозы 2%. Ферментативную активность  $\beta$ -фруктофуранозидаза (ед./см<sup>3</sup>) рассчитывают по формуле

$$\beta - \text{фрук} = \frac{(C_o - C_k) \cdot 2 \cdot 10^6}{t \cdot V \cdot 180},$$

где  $C_o$  и  $C_k$  – концентрация редуцирующих веществ в опытной и контрольной пробе, найденная по калибровочному графику, г/г;

$t$  – продолжительность гидролиза, мин;

$V$  – объем исследуемой пробы, см<sup>3</sup>;

180 – молекулярная масса глюкозы, г/моль;

2 – число молекул моносахаридов;

10<sup>6</sup> – коэффициент перевода граммов в микрограммы.

Способность азотфиксации определяли по суммарному содержанию общего азота при культивировании на питательной среде Александра, которая не содержала соединений азота, с применением реактива Несслера по методике [27]. Содержание общего азота в культуральной жидкости каждого образца определялась по калибровочному графику стандартного раствора серно-кислого аммония концентрацией в пределах от 0,1 до 0,5 мг/мл азота.

Количество синтезируемой бактериями индол-3-уксусной кислоты (ИУК) оценивали методом, описанным в работе [28]. В 50 мл питательной среды Александра вносили 10% бактерий *P. mucilaginosus*, отобранных на стадии экспоненциального роста. В качестве предшественника в питательную среду вносили 0,1% L-триптофана. Контроль синтеза ИУК бактериями проводили через 24; 48 и 72 ч культивирования. Для этого отбирали 5–7 мл культуральной жидкости, отделяли клетки бактерий центрифугированием при 15 000 об/мин в течение 15 мин. 1 мл полученного супернатанта смешивали с 1 мл реагенту Сальковского (1 мл 0,5 М FeCl<sub>3</sub> в 50 мл 35% HClO<sub>4</sub>) и затем добавляли две капли ортофосфорной кислоты и выдерживали в темноте при 37 ± 1°С в течение 30 мин до появления розового цвета раствора. Оптическая плотность этого раствора измерялась на спектрофотометре при 535 нм. Количественно ИУК определялась по калибровочному графику стандартного раствора ИУК в пределах от 10 до 100 мкг/мл.

Толерантность бактерий *P. mucilaginosus* к солям проверяли путем добавления в питательную среду до 2% хлорида натрия.

Эксперименты проводили в трех повторностях и полученные результаты статистически обрабатывали с использованием стандартного пакета программы Excel и программы Statistic 7.

### Результаты и обсуждение

Изучение морфологических характеристик рассматриваемых штаммов бактерий *P. mucilaginosus* показано, что на плотной среде бактерии формируют крупные, круглые, слизистые, прозрачные колонии, поверхность колоний гладкая, профиль выпуклый (рисунок 1). Бактериальные клетки покрыты внеклеточными полисахаридами, защищая их от неблагоприятных условий. При микроскопировании эти клетки бактерий *P. mucilaginosus* обнаруживают Грамм отрицательные палочки с округленными концами (рисунок 2).

Известно, что размер бактериальных клеток зависит от источника углерода, способа и условий культивирования [29]. При культивировании бактерии *P. mucilaginosus* на твердой питательной среде, содержащей сахарозу, при температуре 37 ± 1°С размер палочек бактериальных клеток варьировался в зависимости от штамма (таблица 1). При этом наибольший объем клеток наблюдается у штамма 560, а наименьший объем клеток у штаммов 563 и 567.

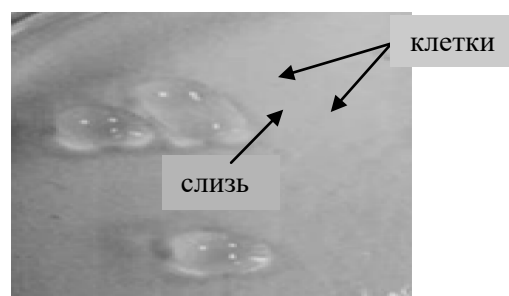


Рисунок 1 – Бактериальные колонии на чашке Петри

Figure 1. Bacterial colonies on the Petri dish



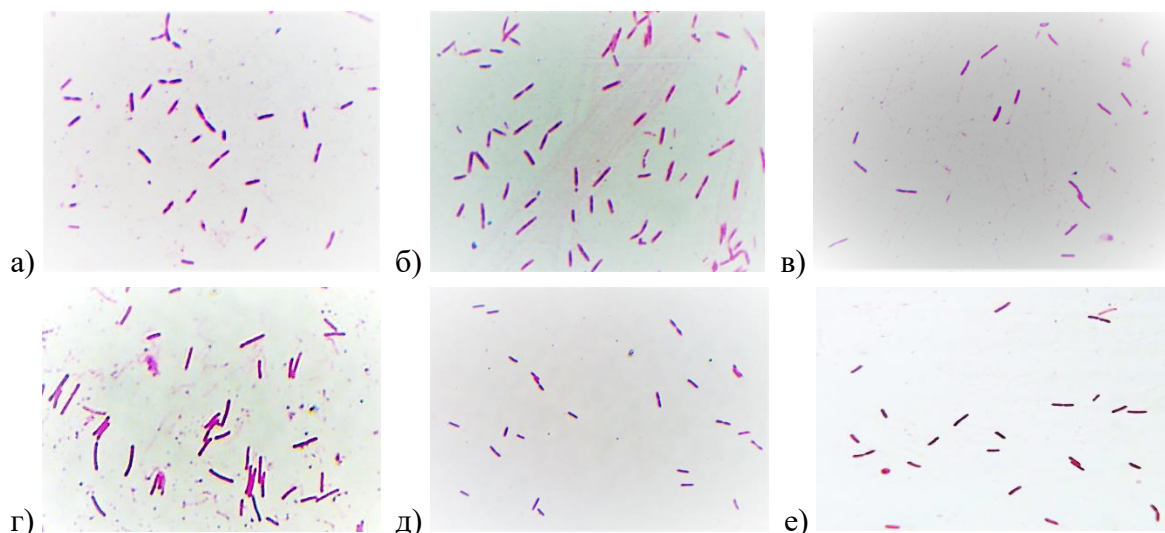


Рисунок 2 – Морфология бактерий *P. mucilaginosus* под микроскопом:  
 а) штамм 560, б) штамм 563, в) штамм 567, г) штамм 568, д) штамм 572, е) штамм 574

Figure 2. Morphology of *P. mucilaginosus* bacteria under microscope:  
 a) strain 560, b) strain 563, c) strain 567, d) strain 568, e) strain 572, f) strain 574

Таблица 1 – Размеры бактериальных клеток *P. mucilaginosus* при культивировании на твердой питательной среде  
 Table 1. Sizes of bacterial cells of *P. mucilaginosus* when cultivated on solid nutrient medium

Параметры клетки	Штамм бактерий					
	560	563	567	568	572	574
L, мкм	8,16 ± 0,54	6,77 ± 0,39	7,54 ± 0,64	10,69 ± 0,64	9,92 ± 1,06	6,98 ± 0,31
D <sub>усл.</sub> , мкм	2,77 ± 0,12	1,88 ± 0,18	1,79 ± 0,22	1,57 ± 0,05	1,67 ± 0,11	2,01 ± 0,11
объем, мкм <sup>3</sup>	48,88 ± 0,006	18,87 ± 0,01	18,95 ± 0,02	20,61 ± 0,001	21,61 ± 0,01	22,24 ± 0,003

Внося перекись водорода на поверхность колоний установлено, что используемые в экспериментах штаммы бактерий *P. mucilaginosus* дают положительный эффект на каталазу, которая способствует эффективному распаду перекиси водорода на кислород и воду.

В таблице 2 представлены кинетические характеристики роста бактерий *P. mucilaginosus*, полученные при глубинном культивировании на питательной среде из сахарозы. Анализ представленных данных показывает, что эффективность роста бактерий зависит от штаммов, которые по количеству генерируемых клеток можно расположить в следующей последовательности 574 > 560 > 572 > 563 > 567 > 568. По окончании культивирования всех штаммов бактерий в культуральной жидкости наблюдалось незначительное остаточное содержание сахарозы. При культивировании рН снижается от 7,5 до 5,0, видимо, за счет образования таких кислых продуктов метаболизма, как органические кислоты: муравьиная, уксусная, щавелевоуксусная, щавелевая, янтарная, винная и т.д. [30].

При культивировании бактерий *P. mucilaginosus* на питательной среде из сахарозы наблюдается явление двойного цикла роста. Вначале бактерии усваивают глюкозу, обеспечивающую более высокую скорость роста (таблица 2), и в то же время синтезируют фермент фосфоглюкоизомеразы, необходимый для усваивания фруктозы на втором этапе цикла роста. Наибольшее приращение числа КОЕ на первой ступени цикла у штамма 574, затем у штамма 560. Для этих штаммов характерно и большее значение приращения числа КОЕ на второй ступени при ассимилировании фруктозы. Аналогичная зависимость наблюдается для удельной скорости роста и времени генерации.

Установлена взаимосвязь времени генерации клеток, выхода экзополисахаридов и остаточного содержания сахарозы в культуральной жидкости с размерами и объемом клеток. Минимальное время генерации первого цикла, максимальный выход экзополисахаридов и минимальное содержание сахарозы в конце культивирования наблюдается у штаммов 560 и 574, которые имеют больший объем клеток по сравнению клетками других штаммов.

Таблица 2 – Кинетические характеристики роста *P. mucilaginosus* при культивировании на питательной среде из сахарозы

Table 2. Kinetic characteristics of *P. mucilaginosus* growth when cultivated on nutrient medium from sucrose

Характеристики роста штамма	Приращение числа КОЕ·10 <sup>5</sup> /мл	pH	Удельная скорость роста*, ч <sup>-1</sup>	Время генерации*, ч	Выход экзополисахаридов**, %	Остаточное содержание сахарозы в КЖ, г/л
Штамм 560	$\frac{1,82}{1,76}$	5,94±0,02	$\frac{0,1838 \pm 0,0149}{0,023 \pm 0,0001}$	$\frac{3,79 \pm 0,31}{30,56 \pm 0,02}$	95,52 ± 0,12	0,0011 ± 0,0001
Штамм 563	$\frac{0,63}{0,11}$	6,18±0,02	$\frac{0,1272 \pm 0,0098}{0,0478 \pm 0,0001}$	$\frac{5,47 \pm 0,42}{14,48 \pm 0,03}$	81,83 ± 0,11	0,0044 ± 0,0001
Штамм 567	$\frac{0,34}{0,12}$	5,90±0,02	$\frac{0,0978 \pm 0,0004}{0,0407 \pm 0,0004}$	$\frac{7,08 \pm 0,03}{17,03 \pm 0,18}$	74,27 ± 0,13	0,0160 ± 0,0002
Штамм 568	0,13	5,07±0,02	0,1519±0,0074	4,57±0,22	52,78 ± 0,10	0,2088 ± 0,0002
Штамм 572	$\frac{0,90}{0,52}$	5,99±0,02	$\frac{0,1620 \pm 0,097}{0,0191 \pm 0,0001}$	$\frac{4,29 \pm 0,26}{36,46 \pm 0,03}$	69,80 ± 0,11	0,0012 ± 0,0001
Штамм 574	$\frac{2,12}{1,92}$	5,89±0,02	$\frac{0,2038 \pm 0,019}{0,0236 \pm 0,0001}$	$\frac{3,42 \pm 0,32}{29,39 \pm 0,03}$	90,98 ± 0,12	0,0011 ± 0,0001

\*в числителе – характеристики при ассимилировании глюкозы, в знаменателе при ассимилировании фруктозы;  
 \*\*выход экзополисахаридов после 48 ч культивирования на питательной среде из сахарозы

Росту бактерий *P. mucilaginosus* на питательной среде из сахарозы способствует синтез бактериями внеклеточного фермента β-фруктофуранозидаза, который гидролизует сахарозу до глюкозы и фруктозы в питательных средах. Как видно из результатов, представленных на рисунке 3, штамм 563 имеет низкую активность β-фруктофуранозидаза (ниже 0,5 ед/см<sup>3</sup>) и самым продуктивным продуцентом фермента является штамм 574 (больше 2 ед/см<sup>3</sup>).

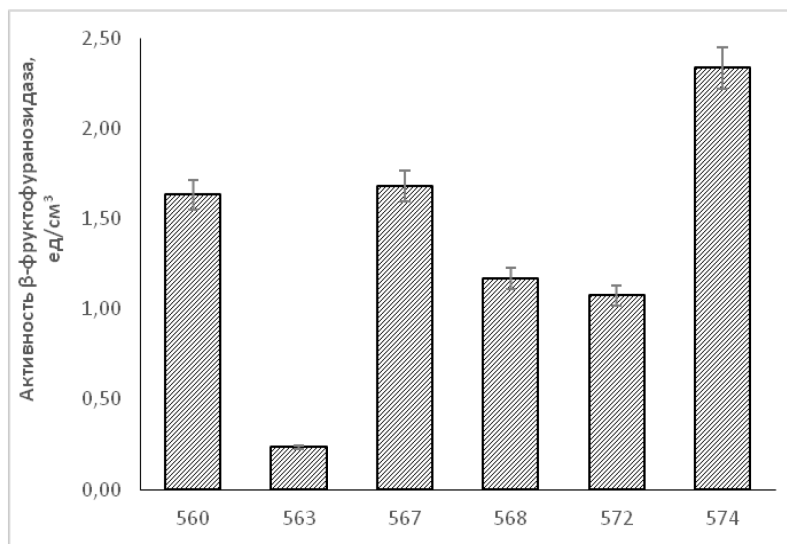


Рисунок 3 – β-фруктофуранозидазная активность бактерий *P. mucilaginosus* после 48 ч культивирования на питательной среде из сахарозы при температуре 30°C

Figure 3. β-fructofuranosidase activity of *P. mucilaginosus* bacteria after 48 hours of cultivation on nutrient medium from sucrose at 30°C

В общем случае по мере увеличения продолжительности культивирования и увеличении числа КОЕ бактерий в культуральной жидкости накапливаются экзополисахариды (рисунок 4). Максимальное накопление экзополисахаридов наблюдается после 48 ч культивирования. В этот период бактерии интенсивно растут и потребляют сахарозу из питательной среды для синтеза экзополисахаридов. При этом все штаммы бактерий при культивировании на сахарозе в течение 48 ч обладают достаточно высоким выходом экзополисахаридов (50–95%) (таблица 2).

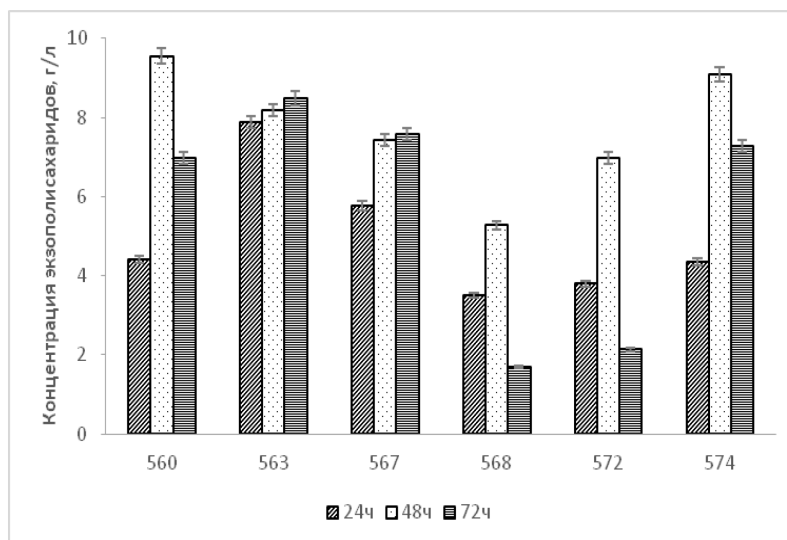


Рисунок 4 – Изменение концентрации экзополисахаридов, синтезируемых бактериями *P. mucilaginosus* при культивировании на питательной среде из сахарозы концентрацией 10 г/л

Figure 4. Changes in the concentration of exopolysaccharides synthesized by *P. mucilaginosus* bacteria when cultured on nutrient medium from sucrose with concentration of 10 g/l

Накопление ЭПС в среде образует вязкий раствор. Значение вязкости культуральной жидкости *P. mucilaginosus* изменяется соответственно данным концентрации экзополисахаридов в среде (рисунок 5). Различный характер изменения вязкости у разных штаммов может быть обусловлен различиями в значениях молекулярной массы синтезируемых экзополисахаридов, а также различным соотношением в их составе ацилированных и неацилированных полисахаридов [31, 32]. Самым эффективным продуцентом экзополисахаридов при культивировании на сахарозе являются штаммы 560 и 574 (выходом около 90–95% от редуцирующих веществ) бактерий *P. mucilaginosus*. К концу культивирования наблюдалось снижение содержания сахарозы как источника углерода в питательной среде. Этому периоду характерно и снижение полисахаридов в культуральной жидкости. Можно полагать, что при недостатке источника углерода бактерии синтезируют гликолитические ферменты, которые гидролизуют частично экзополисахариды, и мономеры этого биополимера используют в качестве источника питания. Однако, эта закономерность не характерна для штаммов 563 и 567.

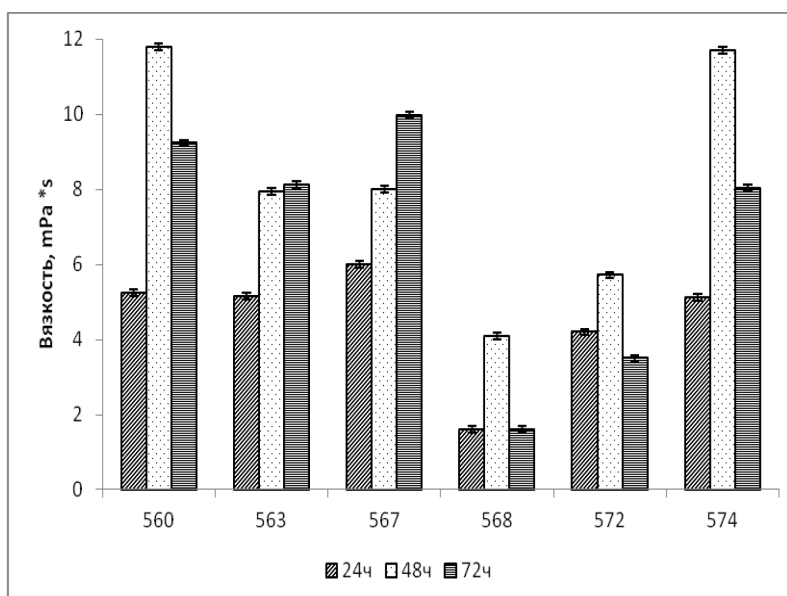


Рисунок 5 – Изменение вязкости культуральной жидкости при культивировании бактерий *P. mucilaginosus* на питательной среде из сахарозы

Figure 5. Change in the viscosity of the culture fluid during the cultivation of *P. mucilaginosus* bacteria on nutrient medium from sucrose

Известно, что бактерии *P. mucilaginosus* характеризуются способностью фиксации азота и применяются в сельском хозяйстве как стимулятор роста растений. Проведенные эксперименты показали, что при культивировании бактерий *P. mucilaginosus* на питательной среде из сахарозы без добавления минерального азота в качестве источника питания количество общего зафиксированного атмосферного азота в культуральной жидкости варьирует от 4,7 до 14,9 мкг/мл (рисунок 6). Представленные результаты показывают, что все используемые в экспериментах штаммы бактерий способны синтезировать нитрогеназу – фермент, который катализирует реакцию азотфиксации. При этом наиболее эффективным азотфиксирующим штаммом является штамм 574 (14,9 мкг/мл).

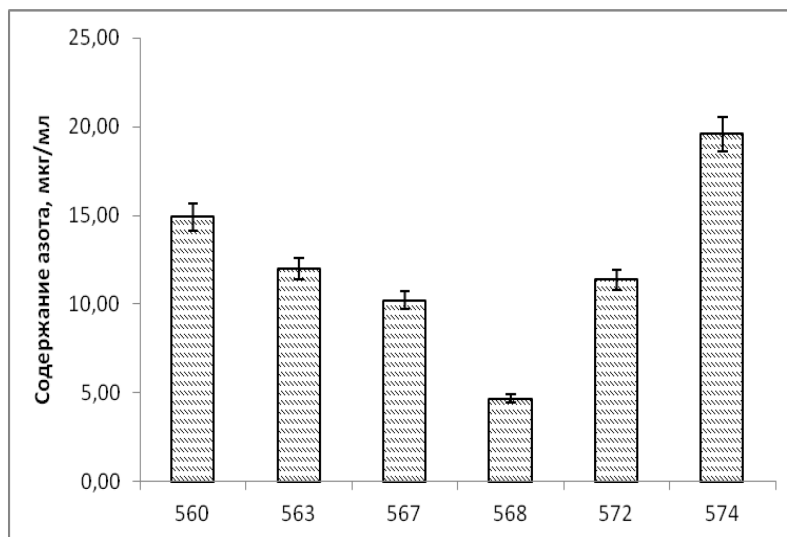


Рисунок 6 – Количество общего азота в культуральной жидкости после 72 часов культивирования бактерий *P. mucilaginosus*

Figure 6. The amount of total nitrogen in the culture fluid after 72 hours of *P. mucilaginosus* bacteria cultivation

При культивировании бактерий *P. mucilaginosus* на питательной среде Александрова с добавлением триптофана концентрацией 0,1 %, продуктивный синтез ИУК этими бактериями зависит от продолжительности культивирования (рисунок 7).

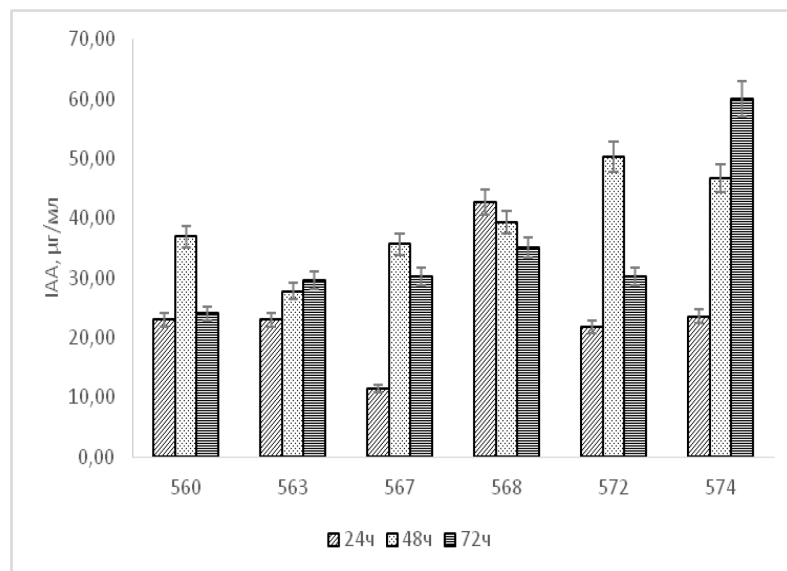


Рисунок 7 – Изменение концентрация продуцируемой ИУК бактериями *P. mucilaginosus* при культивировании на питательную среду Александрова с добавлением триптофана концентрацией 0,1%

Figure 7. Changes in the concentration of *P. mucilaginosus* produced by IAA bacteria when cultivated on Alexandrov's nutrient medium with the addition of 0,1% of tryptophan

В общем случае количество синтезируемых ИУК растет при культивировании до 48 ч и в зависимости от штамма бактерий варьируется от 15 до 65 мкг/мл.

По истечении 72 ч культивирования штамм 574 синтезирует наибольшее количество ИУК, в то время как у штаммов 560; 567; 568; 572 наблюдалось снижение концентрации ИУК в культуральной



жидкости. Это, возможно, связано со способностью этими штаммами деградировать ИУК для поддержания собственного роста или конъюгирования ИУК с сахарами, аминокислотами или белками, присутствующими в питательной среде [16].

По оптической плотности культуральной жидкости, которая зависит в основном от количества биомассы бактерий и экзополисахаридов, можно сделать вывод, что проявление галофильных свойств бактерий *P. mucilaginosus* зависит от штамма и температуры культивирования (рисунок 8).

В общем случае внесение хлорида натрия в культуральную жидкость отрицательно влияет на рост бактерий *P. mucilaginosus*. При этом влияние хлорида натрия на рост бактерий взаимосвязано с температурой культивирования. При температуре культивирования 10°C содержание хлорида натрия 0,02% в питательной среде не оказало существенного влияния на рост всех штаммов бактерий по сравнению с контролем. Дальнейшее увеличение хлорида натрия в питательной среде приводит к снижению роста бактерий (рисунок 8а).

По сравнению с контролем при температуре культивирования 20°C увеличение содержания хлорида натрия в питательной среде вызывает снижению рост бактерий (рисунок 8б).

При температуре культивирования 30°C и внесение в питательную среду хлорида натрия до 0,02% приводит к увеличению роста бактерий штаммов 563 и 567. Дальнейшее увеличение хлорида натрия в питательной среде приводит к снижению роста бактерий. Увеличение хлорида натрия в питательной среде в основном приводит к снижению роста бактерий *P. mucilaginosus* по сравнению с контролем. На рост штамма 568 бактерий *P. mucilaginosus* не сказывает влияние увеличение хлорида натрия в питательной среде до 2%. Этот штамм можно отнести к умеренно галофильным бактериям.

Сравнение оптической плотности культуральных жидкостей указывает на то, что культивирование всех штаммов бактерий при температуре культивирования 30°C в присутствии хлорида натрия более эффективно по сравнению с температурой культивирования этих бактерий 10 и 20°C.

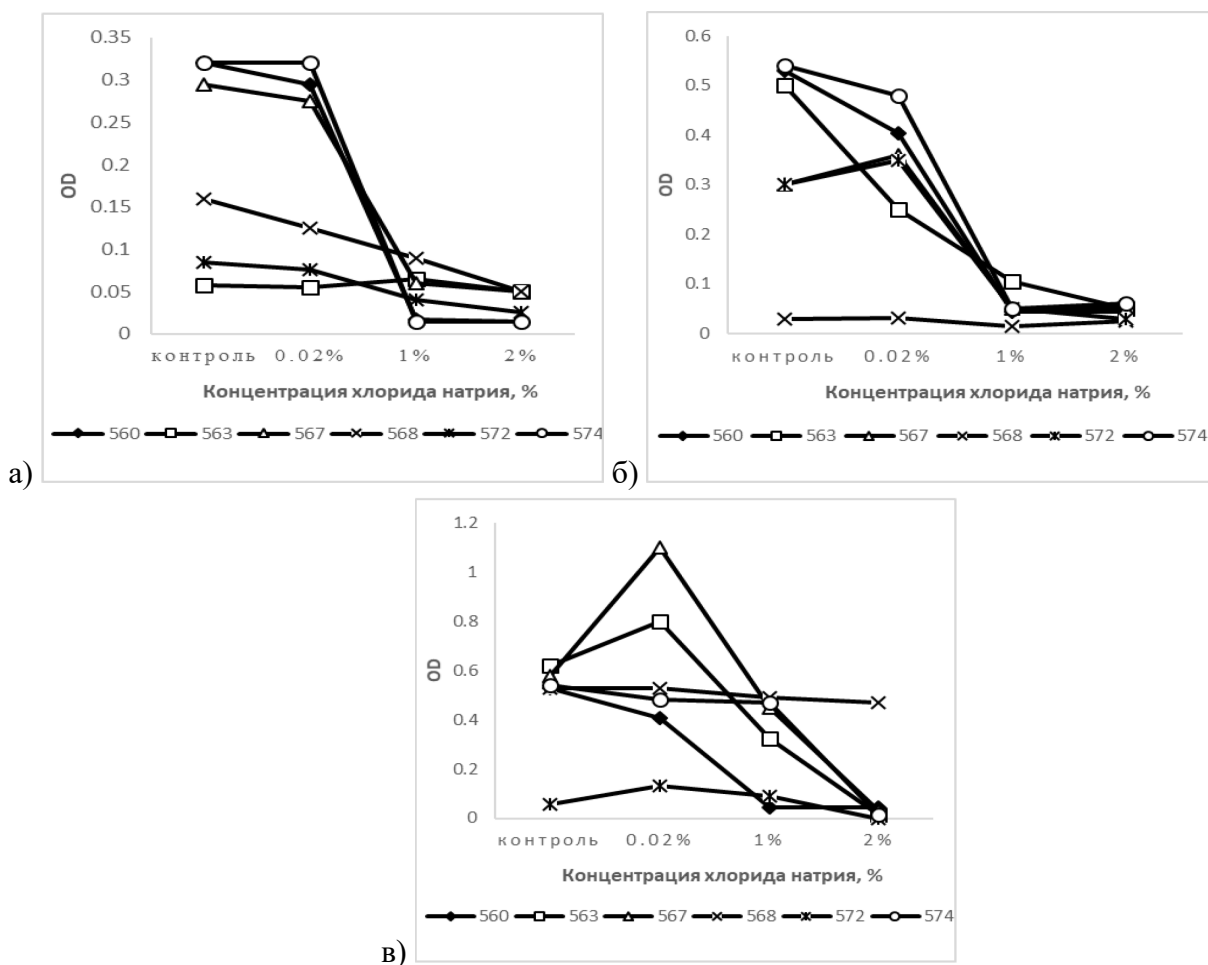


Рисунок 8 – Значение оптической плотности культуральной жидкости после 72 ч культивирования бактерий *P. mucilaginosus* на питательной среде с хлоридом натрия при температуре: а) 10°C; б) 20°C; в) 30°C  
 Figure 8. The value of the optical density of the culture fluid after 72 hours of cultivation *P. mucilaginosus* bacteria on nutrient medium with sodium chloride at the temperature of: а) 10°C; б) 20°C; в) 30°C

### Выводы

1. Показано, что при культивировании штаммов 560; 563; 567; 568; 572; 574 бактерий *P. mucilaginosus* на питательной среде из сахарозы обладают различиями по морфологии, в частности клетки имеют различные размеры. Наблюдается взаимосвязь времени генерации клеток, выхода экзополисахаридов и остаточного содержания сахарозы в культуральной жидкости с размерами и объемом клеток.

2. Показано, что при культивировании штаммов 560; 563; 567; 568; 572; 574 бактерий *P. mucilaginosus* на питательной среде из сахарозы наблюдается двойной цикл роста, который можно отнести к ассимилированию глюкозы на первой ступени и фруктозы на второй ступени роста. При этом удельная скорость роста и время генерации бактерий на первой и второй ступенях различные. Для штамма 568, имеющего длинные клетки и малый условный диаметр клеток, двойной цикл не наблюдается.

3. Установлено, что при культивировании штаммы 560; 563; 567; 568; 572; 574 бактерий *P. mucilaginosus* на питательной среде из сахарозы обладают способностью азотфиксации. Наиболее продуктивным азотфиксирующим штаммом является штамм 574.

4. Установлено, что при культивировании штаммы 560; 563; 567; 568; 572; 574 бактерий *P. mucilaginosus* на питательной среде из сахарозы продуцируют фитогормон – индол-3-уксусную кислоту. Самым эффективным продуцентом фитогормона является штамм 574.

5. Показано, что штамм 568 бактерий *P. mucilaginosus* обладает умеренно галофильными свойствами при мезофильных параметрах температуры культивирования.

6. Показано, что штаммы 560; 563; 567; 568; 572; 574 бактерий *P. mucilaginosus* при культивировании на питательной среде из сахарозы обладают  $\beta$ -фруктофуранозидазной и каталазной активностью.

7. Установлено, что штаммы 560; 563; 567; 568; 572; 574 бактерий *P. mucilaginosus* при культивировании на питательной среде из сахарозы синтезируют экзополисахариды, максимальный выход которых достигается через 48 ч. Дальнейшее культивирование бактерий приводит к деструкции экзополисахаридов гликолитическими ферментами, которые синтезируются бактериями *P. mucilaginosus*.

### References

1. Ash C., Priest F.G., & Collins M.D. Molecular identification of rRNA group 3 *bacilli* (Ash, Farrow, Wallbanks, and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1993, V. 64, Is. no. 3–4, pp. 253–260.
2. Shida O., Takagi H., Kadowaki K., Nakamura L.K., & Komagata K. Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *Int J Syst Bacteriol*. 1997. V. 47, Is. 2, pp. 289–298.
3. Hu X.F., Li Sh.X., Wu J.G., Wang J.F. Transfer of *Bacillus mucilaginosus* and *Bacillus edaphicus* to the genus *Paenibacillus* as *Paenibacillus mucilaginosus* comb. nov. and *Paenibacillus edaphicus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2009, no. 60, pp. 8–14.
4. Aleksandrov V., Blagodyr R., Ilev I. Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate bacteria. *Mikrobiol Z (Kiev)* 1967, no. 29, pp. 111–114.
5. Liu W., Xu X., Wu X., Yang Q., Luo Y., Christie P. Decomposilicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid. *Environ Geochem Health*. 2006, no. 28, pp. 133–140.
6. Basak B., Biswas D. Influence of potassium solubilizing microorganism (*Bacillus mucilaginosus*) and waste mica on potassium uptake dynamics by sudan grass (*Sorghum vulgare* Pers.) grown under two. *Alfisols. Plant Soil*. 2009, no. 317, pp. 235–255.
7. Wang P., Wu S.H., Wen M.X., Wang Y., Wu Q.S. Effects of combined inoculation with *Rhizophagus intraradices* and *Paenibacillus mucilaginosus* on plant growth, root morphology, and physiological status of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) seedlings under different levels of phosphorus. *Horticultural Science*. 2016, no. 205, pp. 97–105.
8. Tang J., Qi S., Li Z., An Q., Xie M., et al. Production, purification and application of polysaccharide-based bioflocculant by *Paenibacillus mucilaginosus*. *Carbohydrat Polymer*. 2014, no. 113, pp. 463–470.
9. Holečková Z., Kulhánek M., Balík J. Use of Active Microorganisms in Crop Production—A Review. *J. Food Process Technol*. 2017, V. 8, Is. 10, pp. 696–704.

10. Lu J.J., Xue A.Q., Cao Z.Y., Yang S.J., Hu X.F. Diversity of plant growth-promoting *Paenibacillus mucilaginosus* isolated from vegetable fields in Zhejiang. *Annal Microbiol.* 2014, no. 64, pp. 1745–1756.
11. Liu G.Y., Lin Y., Huang Z.X. Screening of silicate bacteria with potassium-releasing and antagonistical activity (in Chinese). *Chin. J. Appl. Environ Biol.* 2001, no. 7, pp. 66–68.
12. Kandyba E.V., Nazarov A.G. The bacterial strain *Bacillus mucilaginosus*, which has a wide spectrum of fungicidal action, and a biological product based on it. *Patent RF*, no. 2289 621. 2006.
13. Zhao X.X., Chen H.M., Wu Y.H. Inhibition of silicate bacteria B925 on *Phytophthora parasitica var. nicotianae* and its 16S rDNA sequence analysis (in Chinese). *Tob Sci Technol.* 2007, no. 3, pp. 56–60.
14. Li X., Wu Z.Q., Li W.D., Yan R.X., Li L., Li J., Li Y.H., Li M.G. Growth promoting effect of a transgenic *Bacillus mucilaginosus* on tobacco planting. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, no. 74, pp. 1120–1125.
15. Delker C., Raschke A., Quint M. Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message. *Planta.* 2008, no. 227, 929–941.
16. Shokri D., Emtiazi G. Indole-3-acetic acid (IAA) production in symbiotic and non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria and its optimization by taguchi design. *Curr. Microbiol.* 2010, no. 61, pp. 217–225.
17. Deng S.B., Bai R.B., Hu X.M., Luo Q. Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003, no. 60, pp. 588–593.
18. Lian B., Chen Y., Zhao J., Teng H.H., Zhu L.J., Yuan S. Microbial flocculation by *Bacillus mucilaginosus*: applications and mechanisms. *Bioresour Technol.* 2008, no. 99, pp. 4825–4831.
19. Alkotaini B., Anuar N., Kadhun A.A.H., Sani A.A.A. Detection of secreted antimicrobial peptides isolated from cell-free culture supernatant of *Paenibacillus alvei* AN5. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2013, V. 40, Is. 6, pp. 571–579.
20. Grady E.N., MacDonald J., Liu L., Richman A., Yuan Z.Ch. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb Cell Fact.* 2016, V. 15, 203 p.
21. Moyes R.B., Reynolds J., & Breakwell D.P. Differential staining of bacteria: gram stain. *Current Protocols in Microbiology.* 2009, V. 15, Is. 1, pp. A.3C.1–A.3C.8.
22. Pinchuk I.P., Kirillova N.P., Polyanskaya L.M., Zvyagintsev D.G. The number, biomass and size of bacterial cells in the rhizosphere and the rhizoplane of some plants. *Theoretical and Applied Ecology.* 2014, no. 3. pp. 28–34 (In Russian).
23. Goswami D., Patel K., Parmar S., Vaghela H., Muley N., Dhandhukia P., & Thakker J.N. Elucidating multifaceted urease producing marine *Pseudomonas aeruginosa* BG as a cogent PGPR and bio-control agent. *Plant Growth Regulation.* 2015, V. 75, Is. 1, pp. 253–263.
24. Maier R.M. Bacterial Growth. In *Environmental Microbiology.* Elsevier Inc. 2009, pp. 37–54.
25. Kolesnov A.Yu. *Biological systems in the assessment of food quality (enzymatic analysis).* Moscow, Food industry Publ., 2000. 416 p. (In Russian).
26. Polygalina G.V., Cherednichenko V.S., Rimareva L.V. *Determination of enzyme activity.* Moscow, DeLi print Publ., 2003. 376 p. (In Russian).
27. Cappuccino J.C., & Sherman N. (Eds.). *Microbiology: A laboratory manual.* NY: Benjamin/Cumming. 1992. 458 p.
28. Bric J.M., Bostock R.M., & Silverstone S.E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology.* 1991, V. 57, pp. 535–538.
29. Vadia S., Levin P.A. Growth rate and cell size: a re-examination of the growth law. *Current Opinion in Microbiology.* 2015, V. 24, pp. 96–103.
30. Kuis L.V., Markevich R.M. Acid accumulation in *Bacillus* cultural liquid. *Works of the Belarusian State Technological University. Series 4: Chemistry and technology of organic substances.* 2008. V. 1, no. 4, pp. 195–198 (In Russian).
32. Tregubova K.V., Egorenkova I.V., Ignatov V.V. Physico-chemical characteristics and properties of extracellular polysaccharides of soil nitrogen-fixing bacteria *Paenibacillus polymyxa*. *Strategy of interaction of microorganisms and plants with the environment.* Collection of works. Saratov, Sciences Publ., p. 106. (In Russian).
33. Kodama T., Nakahara T., Omori T., Bink N.T., et al. The formation of extracellular polysaccharides by hydrogen and methane-using microorganisms. *Microbial growth on C<sub>1</sub>-compounds* (Pushchino, 12–16 of September, 1977). Abstracts of Papers. Pushchino, Scientific center biol. researched USSR Academy of Sciences Publ., 1977. p. 213–215 (In Russian).

Статья поступила в редакцию 25.07.2019