

УДК 579.821.11:576.524

## АДГЕЗИВНІ ОСОБЛИВОСТІ ШТАМІВ *MUCOCOCCUS XANTHUS*

О.Л. Рахімова<sup>1</sup>, В.О. Іваниця<sup>1</sup>, О.М. Андрієвський<sup>2</sup>, О.В. Запорожченко<sup>3</sup>

**Адгезивні особливості штамів *Mucococcus xanthus*.** – О.Л. Рахімова<sup>1</sup>, В.О. Іваниця<sup>1</sup>, О.М. Андрієвський<sup>2</sup>, О.В. Запорожченко<sup>3</sup>. – Вивчено адгезію штамів *Mucococcus xanthus* Beebe, 1941 до твердих поверхонь. Виявлено максимальний ступінь адгезії в стаціонарній фазі росту періодичної культури. Встановлено, що при адгезії переважають гідрофобні взаємодії, ступінь яких зростає в присутності інгібітора метаболізму – карбоніл-ціанід *m*-хлорфеніл-гідразону. Показано, що адгезія клітин обумовлюється також електростатичними взаємодіями – аніонними та катіонними. Іони металів у 0,1 мМ концентрації збільшують ступінь адгезії до різних типів поверхонь, а також до деяких типів сорбентів.

**Ключові слова:** міксобактерії, адгезія, гідрофобність

**Адреса:** Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65026, Україна

<sup>1</sup> каф. мікробіології та вірусології, <sup>2</sup> каф. генетики та молекулярної біології, <sup>3</sup> каф. біохімії.

**The particularities of adhesion *Mucococcus xanthus* Strains.** – O.L. Rakhimova<sup>1</sup>, V.O. Ivanitsa<sup>1</sup>, A.M. Andryevsky<sup>2</sup>, O.V. Zaporozhenko<sup>3</sup>. – The adhesion of *Mucococcus xanthus* Beebe, 1941 strains to the solid surfaces were studied. The maximum degree of adhesion was found in the stationary phase of periodic culture. It was shown that hydrophobic interactions predominate at the adhesion processes. The degree of hydrophobic interactions increases in the condition of inclusion of carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl-hydrazone. Electrostatic interactions – anionic and cationic – take part in the adhesion processes too. The degree of adhesion to the different types of surfaces and certain types of sorbets was increased by the metal ions (0.1 mM).

**Key words:** myxobacteria, adhesion, hydrophobicity

**Address:** Odesa National University, 2, Dvoryanskaya Str., Odesa, 65026, Ukraine

<sup>1</sup> Department of Microbiology and virology, <sup>2</sup> Department of Genetics and Molecular Biology, <sup>3</sup> Department of Biochemistry

Міксобактерії є ґрунтовими мешканцями, звичайними практично у будь-яких типах ґрунтів, де вони грають визначену екологічну роль, обумовлену їх здатністю до хижацтва [9]. Однак, у той же час, міксобактерії – це єдина група серед прокариотів, що має складний життєвий цикл. Цей цикл включає процеси клітинної диференціації і морфогенезу, обумовлені взаємодією клітина – клітина і клітина – поверхня розділу фаз. Очевидно, що на всіх етапах життєвого циклу міксобактерій адгезія відіграє важливу роль.

У зв'язку з цим, метою даної роботи було дослідження адгезії клітин двох штамів *M. xanthus*. Для досягнення поставленої мети, нами були пророблені п'ять серій експериментів: 1 серія – вивчення прикріплення бактерій до двох типів поверхонь (гідрофобної та гідрофільної) у залежності від часу культивування; 2 – визначення взаємодії клітинної поверхні з різними сорбентами у залежності від часу культивування; 3 – дослідження впливу протонофора – карбоніл-ціанід-*m*-хлорфенілгідразона (КЦХФ) при виконанні умов досліджень в серіях 1 і 2; 4 – вивчення впливу іонів важких металів при виконанні умов досліджень у серіях 1 і 2; 5 –

дослідження процесу десорбції зазначених штамів.

### Матеріали і методи

В цьому дослідженні нами були використані два штами *M. xanthus* V-25, який був ізольований з чорноземних ґрунтів Ботаничного саду (ОНУ, Україна) і 422, що володіє властивостями типового. Останній був люб'язно наданий професором J. M<sup>a</sup>. Arias-Penalver (Granada University, Spain). Культивування штамів проводили на рідкому середовищі СТ [8] при 30° С у темряві. Оцінку прикріплення до гідрофобної (чашки Петрі (ЧП)) і гідрофільної (чашки для культур тканин (ЧКТ)) поверхонь проводили в присутності солей важких металів: Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 9H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>, NiCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O, CdCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O у концентрації 0,1 та 5,0 мМ з додаванням 0,1 мл 1 · 10<sup>-3</sup> М КЦХФ за методикою McEldowney та Fletcher [7]. Процес відкріплення клітин від субстрату вивчали в умовах впливу хлорамфенікола (5 мкг/мл) та бактеріальної протеази (1 од./5 мл). Результати виражали як відсоток

співвідношення одиниць екстинкції ( $E_{540} \cdot 10^3$ ) у присутності тестових проб до контрольних. Для дослідження гідрофобних, катіонних та аніонних взаємодій ми використовували модифікований метод, запропонований McEldowney і Fletcher [7]. Культури, вирощені у присутності солей важких металів збирали, потім помічали лейцином- $^{14}\text{C}$  і додавали  $10^{-3}$  М КЦХФ. Після чого зразки в обсязі 1 мл пропускали через дублі колонок трьох типів. Ступінь взаємодії оцінювали як відсоток радіоактивності залишившийся в колонці. Експериментальні дані статистично оброблені [2].

Оскільки відомо, що міксобактерії мають складний життєвий цикл, то, насамперед, становило інтерес оцінити їхні адгезивні властивості у відношенні до різних поверхонь в окремих етапах розвитку. Нами були досліджені клітини періодичної культури через 24, 48 і 72 години інкубації. За даними літератури після 24 годин розвитку настає закінчення фази логарифмічного росту, через 48 годин настає стаціонарна фаза, а після 72 годин починається фаза відмирання культури [8]. Отримані результати представлені в таблиці 1.

## Результати й обговорення

Таблиця 1. Адгезія штамів *Mucococcus xanthus* до гідрофобних і гідрофільних поверхонь ( $E_{540\text{тест}} / E_{540\text{контр}} \cdot 10^3$ )

Штам	Умови		Час культивування, год		
			24	48	72
V-25	Гідрофільні	Відсутність КЦХФ	3,00 ± 0,20	3,17 ± 1,00	0,35 ± 0,06
		Присутність КЦХФ	3,00 ± 0,30	3,20 ± 1,00	0,71 ± 0,01
	Гідрофобні	Відсутність КЦХФ	27,00 ± 4,00	30,00 ± 3,00	1,50 ± 0,02
		Присутність КЦХФ	36,00 ± 5,00	31,05 ± 4,00	1,72 ± 0,03
422	Гідрофільні	Відсутність КЦХФ	8,00 ± 0,80	8,50 ± 0,80	0,68 ± 0,06
		Присутність КЦХФ	8,90 ± 0,90	8,57 ± 0,60	1,50 ± 0,06
	Гідрофобні	Відсутність КЦХФ	32,00 ± 6,00	35,55 ± 5,00	2,46 ± 0,03
		Присутність КЦХФ	43,00 ± 7,00	36,17 ± 3,00	2,82 ± 0,04

Примітки: КЦХФ – (carbonil cyanide m-chlorophenyl-hydrazone) карбоніл цянід *m*-хлорфенілгідразон додавали безпосередньо перед експозицією до суспензій клітин в об'ємі 1 мл  $1 \cdot 10^{-3}$  М і інкубували протягом 2 годин при 30 С.

Виявлено, що вивчені штами мають подібні закономірності в динаміці адгезивності: обидва штами краще прикріплюються до гідрофобних поверхонь. Адгезивність зростає в стаціонарній фазі росту (48 годин), що відповідає фазі зрілих плодівих тіл, у порівнянні з пізньою логарифмічною фазою (24 години) і різко знижується в ранній фазі клітинної загибелі (72 години). Максимальна адгезивність у стаціонарній фазі пов'язана, на наш погляд, з тим, що саме в цей період культури приступають до процесу утворення плодівих тіл, що вимагає особливо міцних зв'язків як між самими клітинами, так і між клітинами і поверхнею прикріплення. Адгезивність у присутності КЦХФ у обох штамів

також зростає. Для гідрофільної поверхні цей показник складає, у середньому, 1 %, тим часом як для гідрофобної поверхні, приблизно – 3 %. До найбільшого росту адгезивності присутність КЦХФ приводила в ранній фазі клітинної загибелі для обох штамів і склала близько 50 % для гідрофільної поверхні та близько 15 % для гідрофобної поверхні.

Введення протеази і хлорамфенікола – інгібітора синтезу протеїнів у прокаріотів – в експозиційне середовище не призводило до зниження сорбції клітин: прикріплення до гідрофільних поверхонь у міксобактерій виявилось таким же стабільним, як і прикріплення до гідрофобних (таблиця 2).

Таблиця 2. Частка клітин, що відкріпилися у штамів *Mucococcus xanthus* під впливом хлорамфеніколу, протеази і періодату натрію (%)

Агент обробки	Штам			
	V-25		422	
	Гідрофобна поверхня	Гідрофільна поверхня	Гідрофобна поверхня	Гідрофільна поверхня
Хлорамфенікол	0,0	0,0	0,1	0,0
Протеаза	0,2	0,5	0,1	1,1
Періодат натрію	30,0	10,0	40,0	20,0

Результати цього дослідження демонструють, що синтез білка не має значного впливу на

механізм прикріплення міксобактерій до двох досліджених типів поверхонь. Хлорамфенікол, що

є інгібітором синтезу білка, може опосередковано впливати на адгезію шляхом порушення продукції ензимів, що зв'язані з утворенням інших потенційно адгезивних молекул, таких як полісахариди. Однак, за короткий період експозиції (2 години) синтез нових поверхневих компонентів клітини, що підтримують адгезію, очевидно, не відбувається.

Найбільше сприяє процесу відкріплення міксобактерій від гідрофільної і гідрофобної поверхонь періодат натрію, що здатний руйнувати 1-2, 1-3, 1-4, 1-6-глікозидні зв'язки. Причому, вплив на клітини, прикріплені до гідрофобних поверхонь, був більш значним, ніж на клітини, прикріплені до гідрофільних поверхонь. Це можна пояснити вагомим внеском полісахаридів у прикріплення до гідрофобних поверхонь у досліджених штамів міксобактерій.

Найбільш вірогідно, що для міксобактерій характерна так звана „тимчасова” адгезія, на протипагу існуючої постійної адгезії [5]. За тимчасової адгезії (хоча в цьому випадку бактерії прикріплені досить міцно до поверхонь, щоб не бути вилученими з них) вони можуть пересуваючись по поверхні боком, здійснювати згубальні рухи, відокремлювати частини клітини по довжині від субстрату й обумовлювати тим самим вид поверхні, що лупиться [3]. Загальним для обох типів адгезії є наявність поверхневого полімеру. Для забезпечення тимчасової адгезії цей полімер має бути досить

клейким, щоб забезпечити адгезію, але досить рідким, щоб сприяти переміщенню клітин. У випадку з *M. xanthus* адгезія, можливо, залежить від аттрактивних взаємодій між полімерами вже присутніми на бактеріальній поверхні і на поверхні субстрату.

Непрямим доказом того, що адгезія міксобактерій може залежати від продукції екзополімеру, є загально відомий факт припинення ковзання в присутності високих концентрацій живильних речовин. Це може бути пов'язано з синтезом надлишку екзополімера, або його модифікацією. Однозначно відомо, що ковзні бактерії можуть продукувати більш ніж один екзополімер типу глікопротеїна і/або ліпополісахариду [4]. Таким чином, зміни в кількості, в'язкості, складі, або молекулярній конфігурації полімерів клітинної поверхні, можливо, модифікують адгезивну здатність вивчених бактерій.

Крім того, нами була проведена оцінка стану клітинної поверхні у міксобактерій у різні періоди розвитку популяції, оскільки загально відомо, що адгезивні властивості клітин безпосередньо пов'язані зі станом клітинної поверхні. Для цього була використана взаємодія з ліпофільним сефадексоа, аніонобміною та амфолітною смолами. Отримані результати відбиті в таблиці 3.

Таблиця 3. Відсоток клітин штамів *Mucococcus xanthus*, що зв'язалися з відібраними іонообмінниками на різних етапах культивування

Штам	Іонообмінник	24 год		48 год		72 год	
		Відсутність КЦХФ	Присутність КЦХФ	Відсутність КЦХФ	Присутність КЦХФ	Відсутність КЦХФ	Присутність КЦХФ
V-25	Ліпофільний сефадекс	84±4	90±5	88±5	90±6	96±8	97±6
	Амфолітна смола	73±4	69±3	74±5	71±3	95±8	73±7
	Аніонобмінна смола	53±2	48±3	48±2	46±2	51±4	70±7
422	Ліпофільний сефадекс	80±4	85±5	90±6	91±5	93±6	95±6
	Амфолітна смола	60±3	50±2	85±6	80±7	91±8	90±6
	Аніонобмінна смола	50±2	45±2	55±2	50±1	65±3	60±4

Важливість гідрофобності клітинної поверхні і наявності електростатичних зарядів на ній для адгезії була раніше продемонстрована [6]. Отримані нами результати демонструють, що у клітинних поверхонь обох досліджуваних штамів переважають гідрофобні взаємодії. Ми припускаємо, що фактором, що визначає гідрофобність міксобактерій, є поверхневі компоненти фімбрії. Крім того, їм може бути компонент клітинної поверхні білкового походження, гідрофобність

якого, у свою чергу, може визначитися наявністю неполярних амінокислот.

Примітно, що у міксобактерій знайдено міксобактеріальний гемагглютинин (МБГА), який починає виявлятися на 12 годині розвитку популяції, і кінетика прояву гемагглютининової активності зростає до початку стадії агрегації (48 година). МБГА являє собою периплазматичний білок, слабо зв'язаний з поверхнею клітини і локалізований на одному чи обох клітинних полюсах.

Електростатичні взаємодії також мають місце, причому виявляється як катіонна, так і аніонна взаємодія. В той же час, видно, що до негативно зарядженої іонообмінної смоли адгезія міксобактерій найменша. Можливо, це обумовлено тим, що в даних умовах (нейтральне значення рН, відсутність катіонів у дисперсійному середовищі) дифузійна частина подвійного електричного шару клітини має значні розміри, а поверхні часток смоли володіють високим електронегативним зарядом, що протидіє адгезії мікроорганізмів.

Рівень енергетичного бар'єру, що перешкоджає взаємодії мікроорганізмів з твердими матеріалами, можна зменшити шляхом зниження рН, збільшення іонної сили розчину, нейтралізацією поверхні, чи створенням на взаємодіючих поверхнях протилежних зарядів [1]. Введення в дисперсійне середовище катіонів двох- і трьохвалентних металів веде до

зменшення величин електрокінетичного потенціалу  $\zeta$ , отже, до зменшення сил відштовхування між взаємодіючими поверхнями і значним збільшенням адгезії бактерій. Результати цієї серії експериментів відбиті в таблиці 4.

В умовах нейтрального значення рН і 0,1 мМ концентрації катіонів у дисперсійному середовищі клітинна адгезія до всіх трьох типів сорбентів значно зросла. Хоча важко прямо екстраполювати ці результати на процеси в навколишньому середовищі, ймовірно, що забруднення важкими металами може привести до суттєвих змін життєздатності природних популяцій міксобактерій. Навіть, якщо міксобактерії будуть толерантні до конкретної концентрації металу в навколишньому середовищі, то, ймовірно, будуть утруднені процеси нормального морфогенезу, що базуються на адгезивних здібностях цих мікроорганізмів.

Таблиця 4. Вплив іонів важких металів на відсоток клітин штамів *M. xanthus*, що зв'язалися з відібраними іонообмінниками

Штам	Іонообмінник	Контроль	Cr <sup>3+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>
V-25	Ліпофільний сефадекс	90±1	97±2	99±1	98±2	99±1	98±2	99±1
	Амфолітна смола	70±3	88±2	93±3	83±4	87±3	90±4	79±4
	Аніонобмінна смола	50±3	90±2	99±1	85±3	90±4	100±1	83±2
422	Ліпофільний сефадекс	90±1	99±1	99±1	98±2	97±4	96±2	97±3
	Амфолітна смола	70±2	81±3	90±1	88±4	88±3	86±2	85±3
	Аніонобмінна смола	55±4	90±4	94±3	91±5	92±4	87±1	89±3

Отже, результати експерименту показують, що обидва штами краще адгезуються на гідрофобній поверхні. Введення іонів металів у дисперсійне середовище збільшує адгезію до обох типів поверхонь при концентрації катіонів 0,1 мМ. При

концентрації катіонів 5 мМ нами спостерігався зворотній ефект: адгезія обох штамів на гідрофобних поверхнях зменшувалася.

Таблиця 5. Вплив катіонів металів на прикріплення штамів *M. xanthus* до двох типів твердих поверхонь ( $E_{540\text{гекс}} / E_{540\text{контр}} \cdot 10^3$  клітин, що прикріпилися)

Штам	Катіон металу	Концентрація катіона металу (мМ)					
		Гідрофільна поверхня			Гідрофобна поверхня		
		0	0,1	5,0	0	0,1	5,0
V-25	Cr <sup>3+</sup>	3,0±0,5	8,0±2,0	7,0±2,0	27,0±0,5	33,0±1,0	16,0±5,0
	Ni <sup>2+</sup>	3,0±0,5	4,0±0,5	4,0±0,5	27,0±0,5	28,0±1,0	12,0±2,0
	Cu <sup>2+</sup>	3,0±0,5	5,0±1,0	4,0±0,5	27,0±0,5	28,0±0,5	10,0±2,0
	Zn <sup>2+</sup>	3,0±0,5	4,0±0,5	4,0±0,5	27,0±0,5	30,0±1,0	15,0±3,0
	Cd <sup>2+</sup>	3,0±0,5	6,0±1,0	5,0±0,5	27,0±0,5	31,0±1,0	15,0±4,0
	Pb <sup>2+</sup>	3,0±0,5	4,0±0,5	4,0±0,5	27,0±0,5	32,0±1,0	16,0±5,0
422	Cr <sup>3+</sup>	8,0±1,0	15,0±4,0	15,0±1,0	32,0±1,0	39,0±3,0	18,0±3,0
	Ni <sup>2+</sup>	8,0±1,0	9,0±2,0	10,0±0,5	32,0±1,0	36,0±1,0	14,0±1,0
	Cu <sup>2+</sup>	8,0±1,0	9,0±2,0	10,0±0,5	32,0±1,0	36,0±1,0	14,0±3,0
	Zn <sup>2+</sup>	8,0±1,0	9,0±2,0	10,0±0,5	32,0±1,0	38,0±3,0	15,0±3,0
	Cd <sup>2+</sup>	8,0±1,0	10,0±3,0	12,0±1,0	32,0±1,0	37,0±2,0	15,0±3,0
	Pb <sup>2+</sup>	8,0±1,0	11,0±0,5	12,0±1,0	32,0±1,0	38,0±2,0	16,0±4,0

Однією з причин, що приводять у подібних випадках до зниження прикріплення бактерій до твердих матеріалів, може бути взаємодія катіонів з кислими полімерами клітинної стінки, що супроводжується зменшенням їхніх адгезивних властивостей.

Оскільки експозиція на адгезію у присутності іонів металів відбувалася в рідкій фазі, можливо припустити модифікацію бактеріальної акумуляції за допомогою цієї рідкої фази. Зв'язок з катіоном може змінити поверхню грам-негативних бактерій шляхом збільшення кількості молекул води на поверхні, обумовлюючи тим самим збільшення гидрофільності, що як наслідок веде до зниження бактеріальної адгезії.

Нарешті, ми припускаємо, що механізм, за яким використані нами іони важких металів впливають на процеси прикріплення міксобактерій, може бути скоріше фізико-хімічним, ніж фізіологічним. Однак, у міксобактерій, як і у будь-яких інших організмів, спостерігається

зниження фізіологічної активності в присутності важких металів у відповідь на їхню токсичність. У присутності іонів важких металів ми спостерігаємо в міксобактерій зниження швидкості росту, зменшення кількості біомаси і респірації (за нашими неопублікованими даними). Природно, зміна фізіологічного статусу міксобактерій, може викликати зміни в стані їхньої клітинної поверхні (як це було показано для інших груп бактерій [7]), слідством яких будуть порушення процесу бактеріальної фіксації. В даному дослідженні зазначене припущення доводиться результатами, приведеними в таблицях 4 і 5.

Виражаємо велику вдячність за допомогу в роботі над статтею д.х.н., професору кафедри органічної хімії ОНУ Анікіну Валерію Фомічу та доценту кафедри фізичної та колоїдної хімії ОНУ Пурічу Олександрю Миколайовичу.

1. Кистень А.Г., Кигель Н.Ф., Курдиш И.К., Гордиенко А.С. Вплив деяких фізико-хімічних факторів середовища на адгезію метанотрофних бактерій // Микробиол. журн. – 1996. – Т. 58. – № 3. – С. 62 – 70.
2. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медикобиологических исследованиях с использованием Excel. – Киев: МОРИОН, 2001. – 408 с.
3. Burchard R.P. Gliding motility of prokaryotes ultrastructure physiology and genetics // Ann. Rev. Microbiol. – 1981. – V. 35. – P. 497 – 529.
4. Humphrey B.A., Dickson M.R., Marshall K.C. Physicochemical and in situ observations on the adhesion of gliding bacteria to surfaces // Arch. Microbiol. - 1979. – V. 120. – P. 231 – 238.
5. Marshall K.C. Mechanisms of bacterial adhesion at solid-water interfaces. – 1985. – P. 133 – 161. In: D.C. Savage and M. Fletcher (ed.), Bacterial adhesion. Mechanisms and physiological significance. Plenum press New York.
6. McEldowney S. Effect of Cadmium and Zinc on Attachment and Detachment Interactions of *Pseudomonas fluorescens* H2 with Glass // Applied and Environmental microbiology. – 1994. V. 8. – P. 2759 – 2765.
7. McEldowney S., Fletcher M. Effect of pH, temperature and growth conditions on the adhesion of a gliding bacterium and three nongliding bacteria to polystyrene. Microb.Ecol. – 1988. – V. 16. – P. 183 – 195.
8. Reichenbach, H., and Dworkin, M. 1992. The myxobacteria. In The Prokaryotes, 2<sup>nd</sup> edn. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.H. (eds). Berlin: Springer-verlag. – 1992. – P. 3416 – 3487.
9. Vorokhova, E., Ivanitsa V. The role of myxobacteria in destruction processes of organic matter into natural biocoenosis. Ecological Effects of Microorganism Action. / Materials of International Conference, October, 1-4, 1997, Vilnius, Lithuania, Vilnius. – P. 151-152.

Отримано: 20 січня 2007 р.

Прийнято до друку: 1 лютого 2007 р.