

І.О. Герасименко, І.К. Курдиш

Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,
тел.: +38(044)526 90 11, e-mail:Kurdish@serv.imv.kiev.ua

ВПЛИВ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ФАКТОРІВ НА ДЕГІДРОГЕНАЗНУ АКТИВНІСТЬ *BACILLUS SUBTILIS* IMB B-7023

Мета. Дослідження впливу деяких фізико-хімічних факторів на дегідрогеназну активність *Bacillus subtilis* IMB B-7023. **Методи:** бактерії вирошували в умовах періодичного культивування. Дегідрогеназну активність оцінювали за відновленням в анаеробних умовах 2,3,5-трифенілтетразолій хлориду до трифенілформазану, вміст якого визначали фотоколориметрично. **Результати:** Встановлено, що найвищих значень дегідрогеназна активність набуває у *Bacillus subtilis* IMB B-7023 за температури 37 °С в середовищі, що має рН 7,0. Найбільш високі показники дегідрогеназної активності були отримані за вмісту в ньому 10 г/л глюкози. Встановлено, що іони Mg^{2+} і Ca^{2+} стимулювали дегідрогеназну активність *Bacillus subtilis* IMB B-7023, а іони Fe^{3+} , навпаки, пригнічували її. **Висновки.** Висока чутливість дегідрогеназного комплексу цих бактерій до фізико-хімічних факторів середовища може використовуватися для прогнозування активності даного штаму за дії певних факторів середовища при його застосуванні у складі комплексного бактеріального препарату в агроєкосистемах.

Ключові слова: *Bacillus subtilis*, фізико-хімічні фактори, дегідрогеназна активність.

Дегідрогеназний комплекс мікроорганізмів є одним з основних компонентів енергетичного метаболізму клітин та їх функціонування. До його складу входять піридинзалежні дегідрогенази, коферментами яких є НАД або НАДФ і флавінзалежні дегідрогенази з простетичними групами ФАД або ФМН [4].

Дегідрогеназний комплекс мікроорганізмів є досить чутливим до будь-яких змін в умовах оточуючого середовища. На показники його активності спричиняє помітний вплив концентрація джерел вуглецевого живлення і енергії, температура середовища, вміст різних хімічних речовин, які можуть інтенсифікувати або сповільнювати метаболічні процеси мікроорганізмів [8–12]. Тому дегідрогеназна активність вважається індикатором функціонального стану мікробних популяцій і їх окиснювальної активності [10–12].

Вплив цих факторів на дегідрогеназну активність *Bacillus subtilis* IMB B-7023, що є компонентом комплексного бактеріального препарату для рослинництва [2], не визначався, що не дозволяє прогнозувати можливі зміни



фізіолого-біохімічної активності цих бактерій в агроекосистемах за дії певних факторів середовища.

Зважаючи на це, метою роботи було дослідження впливу деяких фізико-хімічних факторів на дегідрогеназну активність *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був штам фосфатмобілізувальних бактерій *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 [6], що застосовується для виготовлення комплексного бактеріального препарату для рослинництва. Бактерії вирощували протягом 24 год при 28°C і перемішуванні (240 об/хв) в 750 мл колбах Ерленмейера, в які вносили по 100 мл рідкого живильного середовища Спізізена [13].

Отриману суспензію бактерій осаджували на центрифугі ОПН-8 при 6600 g протягом 15 хв за кімнатної температури. Клітини ресуспензували у буфері з певним значенням рН, оптичну густину (ОГ) доводили до 0,5 од, використовуючи фотоколориметр КФК-2МП, довжина оптичного шляху 5 мм і $\lambda=540$ нм.

Визначення дегідрогеназної активності проводили, застосовуючи метод відновлення безбарвної солі 2,3,5-трифенілтетразолій хлориду (ТТХ) в червоно-сполуку трифенілформазан (ТФФ) в анаеробних умовах [1, 5] з наступною екстракцією ТФФ етиловим спиртом. Для визначення дегідрогеназної активності в пробірці Тунберга вносили 2 мл бактеріальної суспензії, по 1 мл 2% розчину глюкози, а в боковий відросток – 0,5 мл 1% розчину ТТХ. Після цього пробірки закривали, вакуумували, вміст бокового відростку переливали в їх головне відділення, суміші інкубували за відповідних температур протягом 1 год. Потім до вмісту пробірок Тунберга додавали 5 мл 96 % етанолу, енергійно струшували і залишали на 20 хв для екстракції формазану. Отриману суміш центрифугували 15 хв при 6600 g. У супернатанті визначали ОГ при $\lambda=490$ нм, використовуючи кювети 10 мм. Кількість ТФФ визначали за калібрувальною кривою. Результати перераховували на суху біомасу бактерій (СБ), яку визначали ваговим методом та за стандартною кривою залежності біомаси від ОГ суспензії. Дегідрогеназну активність виражали у мг ТФФ/г⁻¹ СБ·год⁻¹.

При визначенні впливу різних значень рН на дегідрогеназну активність суспензії бактерій готували у фосфатних буферних системах, що мали рН 5,0; 6,0; 7,0 і 8,0. На основі зазначених буферів готували розчини глюкози для реакційних сумішей. Дегідрогеназну активність визначали за вищеописаною методикою при температурі 28 °С.

Для визначення впливу на дегідрогеназну активність концентрації глюкози її вносили в реакційне середовище в концентраціях 1, 5, 10 і 20 г/л.

Вплив катіонів Mg²⁺, Ca²⁺, Fe³⁺ визначали з використанням хлоридів даних солей. Усі розчини готували на основі тріс-НСІ буфера рН 7,1. Після культивування бактерії двічі відмивали у тріс-НСІ буфері, готували суспензію з заданою ОГ 0,8 од. Отриману суспензію додавали у пробірки по 2 мл, також додавали по 1 мл розчини солей певних концентрацій, 1 мл 2% розчину глюкози і визначали дегідрогеназну активність за описаною вище методикою. Всі досліди



проводили тричі у трьох і більше повторностях. Результати досліджень підлягали статистичній обробці, визначаючи довірчий інтервал середніх показників при вірогідності 95% [3].

Результати та обговорення

Досліджено залежність дегідрогеназної активності *B. subtilis* IMB B-7023 від температури інкубування бактерій. Встановлено, що за її підвищення від 18 до 28 °С дегідрогеназна активність зростала на 50% (рис. 1). Найвищих значень цей показник досягав за температури 37°С. При її підвищенні до 50 °С дегідрогеназна активність знижувалася на 24%. Таким чином, температурний оптимум для прояву дегідрогеназної активності *B. subtilis* IMB B-7023 (37°С) не співпадає з оптимальними значеннями цього показника для росту даного штаму бактерій.

Значний вплив на дегідрогеназну активність *B. subtilis* IMB B-7023 спричиняло рН середовища. Максимальних значень вона досягала при рН 7,0. В середовищі, що мало рН 6,0 їх дегідрогеназна активність знижувалася на 41% (рис. 2), а при рН 5,0 спостерігалася майже повне пригнічення цієї активності. В лужному середовищі (при рН 8,0) також відбувалося зниження дегідрогеназної активності бацил, однак воно було менш помітним, ніж за рН 6,0. Таким чином, отримані результати свідчать про те, що оптимальні значення рН для прояву дегідрогеназної активності *B. subtilis* IMB B-7023 співпадають з відповідними його значеннями для росту даних бактерій.

мг ТФФ·г⁻¹ СБ·год⁻¹

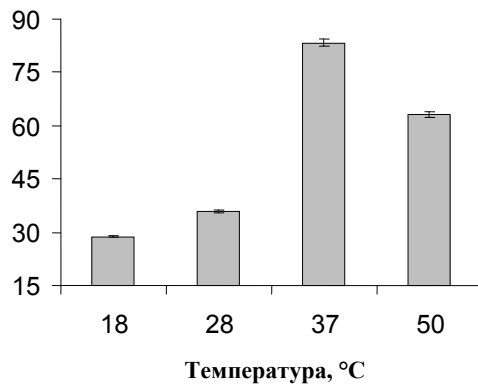


Рис. 1 Вплив температури на дегідрогеназну активність *B. subtilis*

Fig. 1. Influence of temperature on dehydrogenase activity of *B. subtilis*

Показано, що найбільш високих значень дегідрогеназна активність *B. subtilis* досягає при вмісті у реакційній суміші 10 г/л глюкози (табл. 1). За зменшення її концентрації до 5 та 1 г/л досліджуваний показник знижувався, відповідно, на 20,0% та 27,4%. Підвищення вмісту глюкози в середовищі до 20 г/л також супроводжувалося зниженням дегідрогеназної активності майже на 11%.

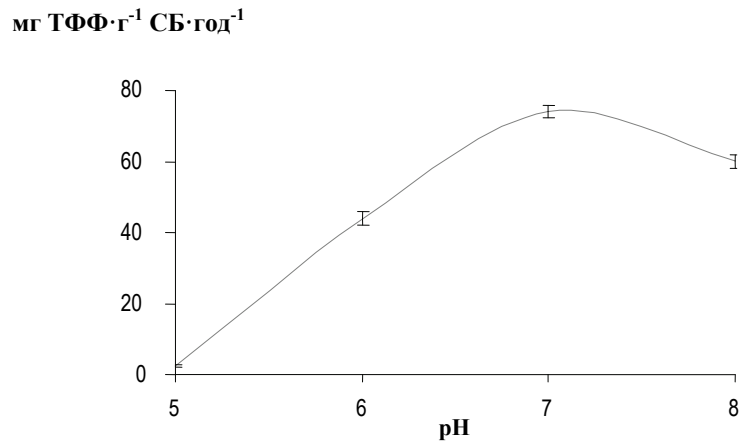


Рис. 2. Залежність дегідрогеназної активності *B. subtilis* від рН середовища

Fig. 2. Dehydrogenase activity dependence of *B. subtilis* on pH medium

Значний вплив на дегідрогеназну активність *B. subtilis* IMB B-7023 спричиняє вміст в середовищі деяких катіонів. Було встановлено, що внесення в середовище досліджених концентрацій Mg^{2+} у вигляді $MgCl_2$ супроводжувалося стимулюванням дегідрогеназної активності *B. subtilis* IMB B-7023. Так, за внесення 0,25–1,0 мМ іонів магнію дегідрогеназна активність зростала по відношенню до контролю на 23 і 43%, відповідно. Найвищих значень цей показник досягав при вмісті в середовищі 10 мМ іонів магнію. Подальше збільшення концентрації магнію супроводжувалося зниженням його стимулювальної дії. Однак, навіть за вмісту в середовищі 30 мМ магнію дегідрогеназна активність бактерій була на 34% вищою від показників у контролі.

Таблиця 1

Залежність дегідрогеназної активності *B. subtilis* IMB B-7023 від концентрації глюкози в середовищі

Table 1

Dehydrogenase activity dependence of *B. subtilis* IMB B-7023 on glucose concentration in the medium

Штам	Дегідрогеназна активність (мг ТФФ/ г ⁻¹ СБ · год ⁻¹) за вмісту глюкози, г/л			
	1	5	10	20
<i>B. subtilis</i> IMB B-7023	52,6 ± 1,8	57,9 ± 1,2	72,5 ± 2,0	64,7 ± 1,9

Ще більш помітний стимулювальний вплив на дегідрогеназну активність *B. subtilis* IMB B-7023 спричиняли катіони кальцію. За вмісту в середовищі 0,25 мМ іону показник цієї ферментативної активності зростав на 29% (табл. 2).



Таблиця 2

Залежність дегідрогеназної активності *B. subtilis* IMB B-7023 від вмісту катіонів магнію та кальцію в середовищі

Table 2

dehydrogenase activity dependence of *B. subtilis* IMB B-7023 on magnesium and calcium content in the medium

Досліджуваний катіон	Дегідрогеназна активність (мг ТТФ/г ⁻¹ СБ·год ⁻¹) у залежності від вмісту катіонів, мМ					
	0-контроль	0,25	0,50	1,00	10,00	20,00
Mg ²⁺	35,0±3,1	43,2±1,5	47,8±1,9	50,0±2,7	54,3±1,4	52,0±2,3
Ca ²⁺	31,3±1,7	40,5±2,6	50,4±1,8	57,2±4,1	61,5±1,6	57,2±4,0

При подальшому підвищенні концентрації кальцію до 0,5 і 1,0 мМ дегідрогеназна активність зростала порівняно з контролем на 61 і 83%. Найвищі її значення були отримані за внесення в середовище 10 мМ іонів кальцію. Подальше підвищення його концентрації в середовищі супроводжувалося зниженням стимулювальної дії цього катіону на дегідрогеназну активність *B. subtilis* IMB B-7023 (табл. 2). Подібні закономірності впливу катіонів Mg²⁺ та Ca²⁺ на дегідрогеназну активність мікроорганізмів характерні й для інших видів мікроорганізмів [6, 7].

В той же час, внесення у середовище інкубування досліджуваного штаму бацил катіонів тривалентного заліза (у вигляді хлориду) супроводжувалося зниженням дегідрогеназної активності (рис. 3). За вмісту 0,125 мкМ Fe³⁺ показник цієї активності знижувався на 37%.

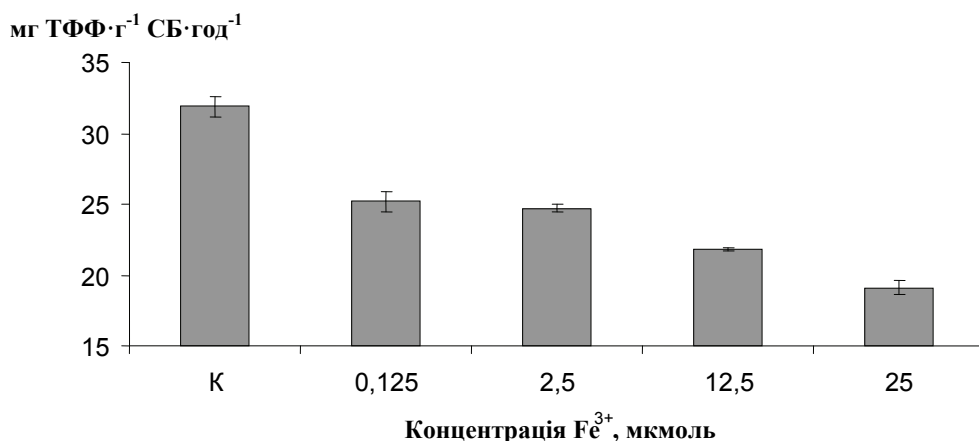


Рис. 3. Залежність дегідрогеназної активності *B. subtilis* IMB B-7023 від вмісту в середовищі Fe³⁺

Fig. 3. Dehydrogenase activity dependence of *B. subtilis* IMB B-7023 on Fe³⁺ content in the medium

Подальше підвищення концентрації даного катіону в середовищі супроводжувалося зниженням дегідрогеназної активності, значення якої при вмісті 25 мкМ Fe^{3+} складало, по відношенню до контролю, лише 24%.

Таким чином, в результаті проведених досліджень було встановлено, що найвищих показників дегідрогеназна активність *B. subtilis* ІМВ В-7023 досягає при температурі 37 °С та рН 7,0 за вмісту в інкубаційному середовищі 10 г/л глюкози. Внесення іонів Mg^{2+} і Ca^{2+} підвищує дегідрогеназну активність *B. subtilis* ІМВ В-7023, а іонів Fe^{3+} – навпаки, знижує її показники. Результати дослідження свідчать про високу чутливість дегідрогеназного комплексу *B. subtilis* ІМВ В-7023 до впливу ряду фізико-хімічних факторів середовища. Цей показник може використовуватися для прогнозування активності даного штаму в агроекосистемах за його застосування у складі комплексного бактеріального препарату в конкретних ґрунтово-кліматичних умовах.

І.А. Герасименко, І.К. Курдиш

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, ул. Академіка
Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03689, Україна,
тел.: +38(044)526 90 11, e-mail: Kurdish@serv.imv.kiev.ua

ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ДЕГИДРОГЕНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ *BACILLUS SUBTILIS* ІМВ В-7023

Реферат

Цель. Исследование влияния некоторых физико-химических факторов на дегидрогеназную активность *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023. **Методы.** Бактерии выращивали в условиях периодического культивирования. Дегидрогеназную активность оценивали по восстановлению в анаэробных условиях 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида до трифенилфор-мазана, содержание которого определяли фотокolorиметрически. **Результаты.** Показано, что наивысших значений дегидрогеназная активность достигает у данного штамма при температуре 37 °С в среде, имеющей рН 7,0. Наиболее высокие показатели дегидрогеназной активности были получены при содержании в ней 10 г/л глюкозы. Установлено, что ионы Mg^{2+} и Ca^{2+} стимулировали дегидрогеназную активность *Bacillus subtilis*, а ионы Fe^{3+} , напротив, угнетали ее. **Выводы.** Высокая чувствительность дегидрогеназного комплекса этих бактерий к физико-химическим факторам среды может использоваться для прогнозирования активности данного штамма при действии некоторых факторов среды в процессе его применения в составе комплексного бактериального препарата в агроэкосистемах.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, физико-химические факторы, дегидрогеназная активность.



I.O. Herasymenko, I.K. Kurdish

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,
154, Zabolotny str., 03143, Kyiv, Ukraine,
tel.:+38(044)526 90 11, e-mail: Kurdish@serv.imv.kiev.ua

INFLUENCE OF PHYSICOCHEMICAL FACTORS ON DEHYDROGENASE ACTIVITY OF *BACILLUS SUBTILIS* IMB B-7023

Summary

Aim. The investigation of the influence of some physicochemical factors on dehydrogenase activity of *Bacillus subtilis* IMB B-7023. **Methods.** The bacteria were cultivated in the periodic process. Dehydrogenase activity was evaluated on reduction of 2,3,5-tetrazolium chloride to triphenylphormazane, the concentration of which was determined by photocolorymetrical methods. **Results.** It was defined that dehydrogenase activity reached the greatest significance in the given strain at the temperature of 37 °C in the media having pH 7.0. The highest indices of dehydrogenase activity have been obtained in the content of 10 g/l glucose in it. It was determined that ions of Mg^{2+} and Ca^{2+} have stimulated dehydrogenase activity of *Bacillus subtilis*, and ions of Fe^{3+} , on the contrary, suppressed it. **Conclusion.** Actual presence of high sensitiveness of the dehydrogenase complex of these bacteria to physicochemical factors of the environment can be used for making up the prognoses of the given strain activity under certain factors of the environment in its use as a complex bacterial preparation in agroecosystems.

Key words: *Bacillus subtilis*, physicochemical factors, dehydrogenase activity.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Инишева Л.И., Ивлева С.Н., Щербакова Т.А. Руководство по определению ферментативной активности торфяных почв и торфов. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2002. – 119 с.
2. Курдиш И.К. Интродукція мікроорганізмів у агроєкосистеми. – Київ: Наукова думка, 2010. – 253 с.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. – 351 с.
4. Ленинджер А. Биохимия. М.: – Мир, 1974. – 956 с.
5. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)/ Под ред. Прохоровой М.И. – Ленинград: изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.
6. Патент України № 54923 А. Штам *Bacillus subtilis* для одержання бактеріального препарату для рослинництва / Курдиш І.К., Рой А.О. / Опубл. 17.03.2003. Бюл. № 3.
7. Практикум по агрохимии / Под ред. академика РАСХН В.Г. Минеева. – Москва: Изд-во МГУ, 2001. – 689 с.
8. Улахович Н.А., Медянцева Э.П., Бабкина С.С., Кутырева М.П., Гатаулина А.Р. Металлы в живых организмах. – Казань: Казанский ун-т, 2012. – 102 с.
9. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука, 2005. – 252 с.



10. *Camina F., Trasar-Cepeda C., Gil-Sotres F., Leiros C.* Measurement of dehydrogenase activity in acid soils rich in organic matter// *Soil. Biol. Biochem.* –1998. – 30, N 8/9. – P. 1005–1011.
11. *Mathew M., Obbard J.P.* Optimization of the dehydrogenase assay for measurement of indigenous microbial activity in beach sediments contaminated with petroleum// *Biotechnol. Lett.* – 2001. – 23. –P. 227–230.
12. *Nweke C.O., Alisi C.S., Okolo J.S., Nwanyanwu C.E.* Toxicity of zinc to heterotrophic bacteria from a tropical river sediment // *Appl. Ecol. and Environm. Res.* – 2008. – 5. № 1. – P. 123–132.
13. *Spizizen J.* Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1958. – 44. – P. 1072–1078.

Стаття надійшла до редакції 08.09.2014 р.

