

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского

Биология. Химия. Том 5 (71). 2019. № 2. С. 3–10.

УДК 57.579.2

МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДИССОЦИАНТОВ

B. SUBTILIS subsp. *INAQUOSORUM*

Абибуллаева Э. Х.¹, Сидякин А. И.^{1,2}, Решетник Г. В.¹

¹Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия

²НПО Биотехсоюз, Москва, Россия

E-mail: abibullaeva.ewelina@yandex.ru

Изучены морфолого-культуральные и цитоморфологические особенности исходных штаммов *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* и их диссоциантов. Выявлены различия морфологических свойств колоний выращенных на различных питательных средах в пределах диссоциантов исследуемого штамма. Проведен сравнительный анализ морфологических и цитологических особенностей не только между диссоциантами исследуемого штамма, но и между исходным штаммом и его диссоциантами.

Ключевые слова: диссоциация, *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*, штамм, физиолого-биохимические и морфологические свойства.

ВВЕДЕНИЕ

Еще с 40–50-х г.г. двадцатого столетия в микробиологии широко известен и детально исследуется принцип диссоциации штаммов – т.е. расщепления однородной популяции, часто полученной из единственной клетки, на варианты, различающиеся генетическими, физиолого-биохимическими и морфолого-культуральными свойствами [1].

Бактерии рода *Bacillus* встречаются повсеместно: в почве, воде, воздухе, пищевых продуктах, организме человека, животных и насекомых [2]. Аэробные спорообразующие бактерии, которые объединяются в род *Bacillus*, включены в семейство *Bacillaceae*. Диагностическими признаками этого рода являются: образование эндоспор, наличие каталазы, а так же положительная окраска по Граму [3, 4].

В связи с тем, что в научной литературе часто описывается диссоциация промышленных и лабораторных штаммов микроорганизмов, которая может оказывать как отрицательное, так и положительное воздействие на целевые свойства штаммов, проблема исследования внутриштаммовых различий коллекционного штамма *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* S 81, используемого в производственной деятельности НПО Биотехсоюз представляется актуальной и перспективной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследований отобраны: 7 диссоциантов *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* (№ 002; № 004; № 003; № 012; № 017; № 018; № 021), полученные при многократных пересевах исходного штамма (S 811), хранившегося в виде чистой моноштаммовой культуры, в коллекции НПО Биотехсоюз в замороженном состоянии при -24 °С; и методом последовательных пересевов каждые 6–12 месяцев на протяжении 4 лет. «Родословная» диссоциантов представлена на рисунке 1.

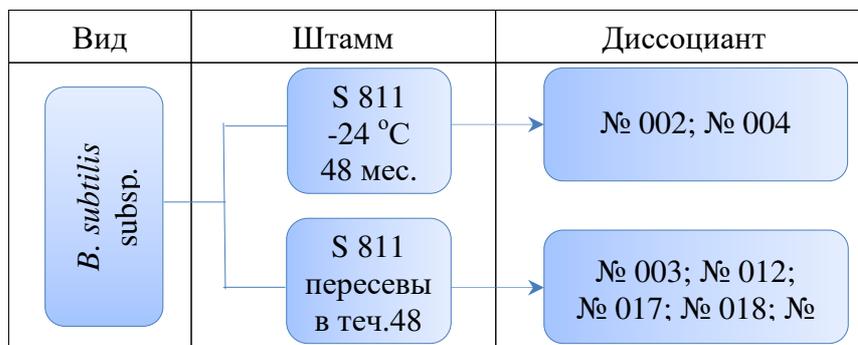


Рис. 1. Схема получения диссоциантов *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* использованных в эксперименте.

В работе использовались следующие **методы**: культуральный (стандартный посев на питательные среды МПА, КГА, ОКС); микроскопия (окраска по Граму в модификации Синева).

На питательных средах МПА, КГА и ОКС исследовали: размеры колонии, тип (очертания колонии, оптические свойства, цвет, поверхность колонии, консистенцию, а также способность к эмульгированию) при поверхностном росте, при культивировании посевов в термостате в течение 1-7 суток при температуре 36 °С. В мазках окрашенных по Граму в модификации Синева исследовали размеры клеток, а также грамвариабельность культур [5].

В ходе выполнения исследований и при оформлении работы использовали **программное обеспечение**: внутреннее приложение Windows XP и пакет прикладных программ Microsoft Office. Фотосъемку проводили цифровой фотокамерой фотокамерой Nikon COOLPIX A10 (Nikon Corp., Japan). Микрофотосъемку осуществляли цифровой фотокамерой TC-500 (5,0 Мпикс), интегрированной с системой анализа и обработки изображений MicroАнализView версия 3.01; измерение размеров клеток проводили на фотографиях при помощи пакета прикладных программ ImageTool v 3.00 (UTHSCSA). Фотографии и рисунки обрабатывались при помощи пакета прикладных программ CorelDraw 13.0. **Статистическая обработка данных.** Все эксперименты проводили в трехкратной биологической и двукратной аналитической повторности, а полученные экспериментальные данные подвергались статистической обработке с помощью методов статистического анализа [6–8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Так как в многочисленных исследованиях показано [3, 9, 10], что диссоциация во многом затрагивает морфологию клеток бактерий, а именно: размеры клеток, особенности расположения клеток после деления, строение клеточной оболочки бактерий, и связанные с этими явлениями фирмакутность или грациликнутность клеток, то особый интерес представляет исследование особенностей окраски по Граму исследуемых диссоциантов, и особенностей цитоморфологии такие как размеры клеток и их расположение в мазках.

Изучение морфологических особенностей исходного штамма *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* 1 S811 на дифференциально-диагностических питательных средах МПА, КГА и ОКС показало, что через 24 часа культивирования при t 36⁰С образуются колонии около 2 мм в диаметре, складчатые, сухие, матовые, бежевого цвета. На 2 и 3 сутки цвет колоний изменялся до светло-коричневого, однако остальные характеристики штамма оставались прежние: R-тип с плоским профилем, нитчатым краем и струйчатой структурой. Однако, на питательной среде ОКС рост исходного штамма на 1 сутки был точечный, а к 9 суткам колонии имели блестящую гладкую поверхность, неровный край, бежевый цвет с диаметром колоний до 4 мм. Клетки грамположительные, расположенные попарно.

Диссоциант исходного штамма 1 S 811 №002 на питательных средах МПА, КГА и ОКС через 24 часа культивирования формирует точечные колонии. На 2 сутки на МПА и КГА колонии приобретают кремовую окраску, круглую форму, складчатую, матовую, шероховатую поверхность с нитчатым краем и струйчатой структурой. Коричневый цвет колоний со светлой каемкой формируется у данного диссоцианта лишь на 7 сутки на питательной среде МПА, в отличие от КГА, колонии которого при данных условиях культивирования отличаются не только бежевым цветом, но и блестящей в центре поверхностью. Рост исследуемого диссоцианта на ОКС был зафиксирован лишь к 7 суткам культивирования. Бежевые, круглые, с ровным краем колонии имели блестящую поверхность. Клетки исследуемого диссоцианта расположены в мазках цепочками длиной $4,67 (\pm 0,61) \times 1,47 (\pm 0,23)$ мкм.

Изученные морфологические особенности второго диссоцианта (№004) показали, что типичные R-типа колонии формируются на КГА и МПА после 1 суток культивирования, а на ОКС диаметр колоний достигает 4 мм лишь на 7 сутки. Кратерообразные, неровные колонии формирует диссоциант на 9 сутки на ОКС, а на КГА и МПА колонии отличаются круглой с каемкой по краю формой и блестящей в центре, гладкой поверхностью. Клетки диссоцианта №004 сходны с №002 цепочечным расположением в мазках, но отличаются меньшим размером.

Исследование морфолого-культуральных свойств исходного штамма *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* 2 S811 показало, что на питательной среде КГА колонии формируются около 20 мм в диаметре к 7 суткам. Данная «продуктивность» не характерна штамму на МПА и ОКС. Видимый рост на данных средах зафиксирован лишь на 2 – 7 сутки. При этом колонии имели светло-коричневую окраску на МПА на ОКС цвет колоний к 9 суткам был желтый. Структура, край и тип колоний в пределах данных сред оставались постоянными. Клетки грамположительны, в мазках располагаются одиночно и размер клеток достигает $4,38 (\pm 0,80) \times 1,62 (\pm 0,29)$ мкм.

Изучение морфологических и тинкториальных свойств диссоцианта №003 показало, что клетки грамположительны и на питательных средах МПА и КГА формируют сходные колонии. На КГА размер колоний несколько больше, чем на МПА и составляет 10 мм. На среде ОКС диаметр колоний 2 мм зафиксирован на 9 сутки, ранее рост не был выявлен.

На питательной среде КГА колонии диссоцианта №012 круглые, складчатые, матовые, сухие, тестообразной консистенции, приобретающие коричневую окраску с каемкой по краю и выпуклый профиль к 7 суткам культивирования. Сходные характеристики имеет диссоциант и на МПА, в отличие от ОКС. На данной небогатой питательными веществами среде колонии формируются через 48 часов роста при стандартных условиях культивирования. Визуально белые, полупрозрачные, складчатые, сухие колонии имели шероховатую поверхность и неправильную форму. Цвет колоний исследуемого диссоцианта на ОКС не изменялся на протяжении всех 9 суток роста.

Небольшие колонии диаметром до 4 мм формирует на 9 сутки диссоциант штамма *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* 2 S811 №017. Плохо эмульгирующие в воде с мелкозернистой структурой колонии образуются на МПА и КГА и имеют кремовую окраску. Клетки в мазках располагаются как одиночно, так и попарно, размеры клеток составляют приблизительно $4,0 \times 1,5$ мкм, грамположительны.

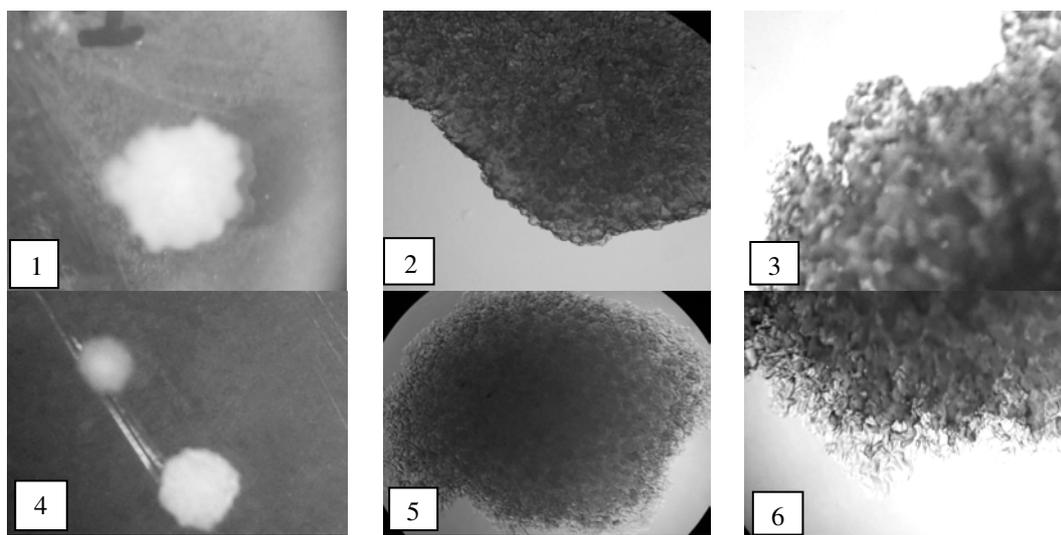


Рис. 2. Морфология колоний диссоциантов *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* при их выращивании на питательной среде КГА (24 часа, 36°C). 1, 2, 3 – Диссоциант № 004; 4, 5, 6 – исходный штамм 2S811; 1, 4 – общий вид колоний; 2, 5 – общий вид колоний под бинокляром (ув. $\times 24$); 3, 6 – край и структура колоний под микроскопом (ув. $\times 100$)

На ОКС рост диссоцианта № 018 хоть и был зафиксирован лишь на 2 сутки, однако по сравнению с ростом колоний на МПА и КГА диаметр был максимальным

и составлял 10 мм. R-типа колонии приобретают светло-коричневую окраску через неделю после культивирования на МПА и КГА.

Грамположительные клетки последнего диссоцианта № 021, имеющие средний размер клеток, формируют колонии R-типа на представленных дифференциально-диагностических средах.

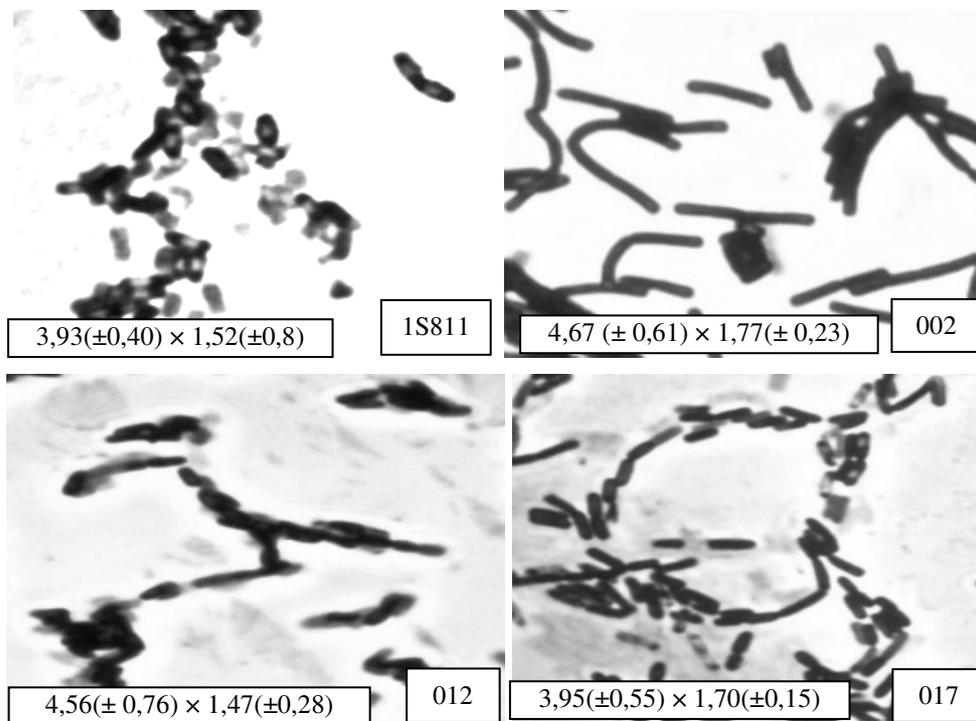


Рис. 3. Морфологические особенности и размеры клеток $D \times d (\pm Sx_i)$ клеток *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* (мазки суточной культуры, выращенные на МПА, окрашенные по Граму в модификации Синева; ув. $\times 1000$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выделены и получены диссоцианты штаммов *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*, которые различаются по морфолого-культуральным и цитоморфологическим свойствам. Исходные штаммы на питательной среде МПА и КГА образуют колонии крупных размеров (примерно, до 6 мм на третьи сутки культивирования и до 17 мм на десятые сутки) по сравнению с диссоциантами. На питательной среде ОКС рост колоний значительно затянута во времени, колонии явных размеров формируются примерно лишь на седьмые сутки культивирования. На девятые сутки культивирования самые крупные колонии формирует диссоциант № 018, диаметр клеток составляет 10 мм. Цвет и форма колоний также изменяются не только в пределах штаммов, но и в пределах диссоциантов. На питательной среде ОКС

колонии формируются бежевого цвета (№ 002 и № 004), шероховатые, матовые. В отличие от питательной среды ОКС на МПА формируются колонии в основном коричневого цвета (№ 002, № 017, № 018), матовые, шероховатые.

Цитоморфологические особенности штаммов *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* и диссоциантов показали, что как исходные штаммы так и их диссоцианты являются грамположительными, также имеют особенности. Размер клеток и расположение на мазках исследуемых культур различны: клетки располагаются одиночно, попарно или собраны в цепочки различной длины. Общим для штаммов и диссоциантов является также то, что клетки всех штаммов и диссоциантов грамположительны.

Список литературы

1. Васильев Д.А. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики / Д.А. Васильев, А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин // Ульяновск: НИИЦМиБ УлГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. – 98 с.
2. Бакулина Л.Ф. Пробиотики на основе спорообразующих микроорганизмов рода *Bacillus* и их использование в ветеринарии / Л.Ф. Бакулина, И.В. Тимофеев, Н.Г. Лерминова, А.Ф. Полушкина, Н.И. Печоркина // Биотехнология – 2004. – №2. – С. 48–56.
3. Bergey. Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3: The Firmicutes./ P.Vos, G.Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.-H. Schleifer, W. Whitman // изд-во: Springer. – 2009. – 1422 с.
4. Милько Е.С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации / Е.С. Милько, Н. С. Егоров // Изд-во МГУ.:М. – 1991 – 142 с.
5. Пименова М.Н. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / М.Н. Пименова, Н. Н. Гречушкина, Л.Г. Азова, Л.И. Нетрусов, Е. В. Семенова, Н. Н. Колотилова, Л.М. Захарчук, В.В. Зинченко, С. И. Мыльникова, М. В. Нефелова, И.В. Ботвинко // Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Учеб. пособие- 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.
6. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – 3-е изд., испр. – Минск: Высш. школа, 1973. – 320 с.
7. Плохинский Н. А. Математические методы в биологии / Н. А. Плохинский. – М.: изд-во МГУ, 1978. – 265 с.
8. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – 4-е изд., пер. и доп. – М.: Высшая школа, 1990. – 354 с.
9. Choudhury B. The Structure of the Major Cell Wall Polysaccharide of *Bacillus anthracis* Is Species-specific / B. Choudhury, C. Leoff, E. Saile, P. Wilkins, C. Quinn, E. Kannenberg, R. Carlson // J. Biol. Chem. Sep. – 2006. – 281 p.
10. Doroshenko E. Characterization of *Bacillus cereus* Dissociants / E. V. Doroshenko N. G. Loiko, O. N. P'inskaya, A. I. Kolpakov, I. B. Gornova, E. V. Klimanova, G. I. El'-Registan // Microbiology. – 2001. – Volume 70, Issue 6. – P. 698–705.

MORPHOLOGICAL-CULTURAL FEATURES OF DISSOCIANTS *B. SUBTILIS* subsp. *INAQUOSORUM*

Abibullayeva E. K.¹, Sidyakin A. I.^{1,2}, Reshetnik G. V.¹

¹V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia

²Research and production association Biotechsoyuz, Moscow, Russian Federation

E-mail: abibullaeva.ewelina@yandex.ru

The purpose of this work is to study the dissociation of the collection strain *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* S 811 which is used in production activity of research and

production association Biotechsoyuz. For the study, 7 dissociants *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* No. 002; No. 004; No. 003; No. 012; No. 017; No. 018; No. 021, which have been obtained during the repeated reseeded of the original strains (1 S 811 and 2 S 811) and stored as pure monostrain cultures in the collection of research and production association Biotechsoyuz under refrigeration at -24° C (1 S 811), as well as through the sequential reseeds every 6-12 months over a period of 4 years (2 S 811), have been selected.

The study of morphological features of dissociates and initial strains of *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* at their cultivation on the nutrient medium of potato dextrose agar has shown that after 24 hours of cultivation, the pointlike growth was formed by colonies of the original strain 1S 811 and of the dissociant No. 002. The dissociants and original strains form R-type colonies after 24 hours of cultivation. On the 7th day of cultivation, the sizes of the colonies of original strains reached up to 20 mm in diameter, in contrast to their dissociates whose colonies sizes reached from 9 up to 12 mm in diameter, colonies of the R-type.

At the cultivation of colonies *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* on the nutrient medium of meat-and-peptone agar, there was a pointlike growth of the original strain 2S811 and of the dissociation No. 002 on the first day of cultivation. On the 7th day, the dissociant No. 003 has formed colonies with a smooth surface, even border and with a fine-grained structure. The dissociants No. 021 and No. 012 formed the maximum size of the colony – up to 12 mm in diameter, in comparison with other dissociates.

At the cultivation on the organic acid nutrient medium, the growth was recorded only on the 7th day. The dissociants No.002; No. 012; No.017 and No. 021 form colonies about 4 mm in diameter, are beige, plicate. At the dissociant No. 003 the colonies growth still remained pointlike on the 7th day of cultivation.

At the dissociants *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* on the organic acid nutrient medium within 9 days of cultivation, the colonies morphology within the strain has changed, but within all the dissociants remained homogeneous.

Cytomorphological features of strains *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* and of the dissociants have shown that both the original strains and their dissociants are gram-positive, and have peculiar features as well. The size of the cells and location on the smears of the cultures are different: the cells are located singly, pairwise or the cells are assembled into chains of different lengths.

In the course of this study, the dissociants of the strains *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* have been isolated and obtained. They differ in morphological-cultural and cytomorphological properties both within the same strain and within the investigated dissociants.

Keywords: dissociant, *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*, strain, physiological-biochemical and morphological properties.

References

1. Vasilyev D.A., Kaldyrkayev A.I., Feoktistova N.A., Aleshkin A.V., Identification of bacteria *Bacillus cereus* based on their phenotypic characteristic, *Ulyanovsk*, 98 (2013).

2. Bakulina L.F., Timofeyev I.V., Lerminova N.G., Polushkina A.F., Pechorkina N.I., Probiotics based on the sporogenous microorganisms of the genus *Bacillus* and their use in veterinary, *Biotechnology*, **2**, 48, (2004).
3. Bergey's, Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.-H., Whitman W., Manual of Systematic Bacteriology, *Springer*, 1422 (2009).
4. Mil'ko E.S., Yegorov N.S., Heterogeneity of bacteria population and the process of dissociation, *publ. of the Moscow State University*, 142 (1991).
5. Pimenova M.N., Grechushkina N.N., Azova L.G., Netrusov L.I., Semenova E.V., Kolotilova N.N., Zakharchuk L.M., Zinchenko V.V., Myl'nikova S.I., Nefelova M.V., Botvinko I.V., Study guide to the practical studies of microbiology, *Teaching guide.: publ. of the Moscow State University*, 224 (1995).
6. Rokitskiy P.F. *Biological statistics*, Vyssh. shkola, 320 (1973).
7. Plokhinskiy N.A. *Mathematical methods in biology*, 265 (publ. of the Moscow State University 1978).
8. Lakin, G. F. *Biometry*, Vysshaya shkola, 354 (1990).
9. Choudhury B., Leoff C., Saile E., Wilkins P., Quinn C., Kannerberg E., Carlson, R., «The Structure of the Major Cell Wall Polysaccharide of *Bacillus anthracis* Is Species-specific» *J. Biol. Chem.*, 281 (2006).
10. Doroshenko E.V., Loiko N. G., Il'inskaya O. N., Kolpakov A. I., Gornova I. B., Klimanova E. V., Characterization of *Bacillus cereus* Dissociants, *Microbiology*, **70**, **6**, 698 (2001).