

УДК 579.6

РЕАКЦИЯ ХЛОРИДА КАЛЬЦИЯ С ЭКЗОПОЛИМЕРНЫМ АЛЬГИНАТНЫМ МАТРИКСОМ, ОБРАЗОВАННЫМ ШТАММАМИ PSEUDOMONAS AERUGINOSA

¹Малинов Е.С., ¹Шестаков А.Г., ²Семёнов А.М., ¹Молофеева Н.И., ¹Пульчеровская Л.П., ¹Карамышева Н.Н., ¹Сверкалова Д.Г., ³Батраков В.В., ¹Васильев Д.А.

¹ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина», Ульяновск, e-mail: jenek-malinin@rambler.ru;

²ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва;

³ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова», Ульяновск

Проведены исследования реакции раствора хлорида кальция с экзополимерным альгинатным матриксом, образованным штаммами бактерии *Pseudomonas aeruginosa*. В ходе эксперимента было использовано 38 штаммов бактерии *Pseudomonas aeruginosa* из них 4 референс-штамма. Культивирование бактерии *Pseudomonas aeruginosa* осуществляли в жидкой синтетической среде, в которой и формируется экзополимерный матрикс, и в ГРМ-бульоне. Культивирование проводили в термостате при 37°C. Оценку результатов проводили каждые 24 часа в течение 96 часов. В результате эксперимента выяснили, что при добавлении в 10% раствор хлорида кальция 1 мл бактериальной культуры из жидкой синтетической среды выпадает белый хлопьевидный коллоид кальциевых солей альгиновых кислот. А при добавлении в 10% раствор хлорида кальция 1 мл бактериальной культуры из ГРМ-бульона выпадение каких-либо осадков не наблюдали.

Ключевые слова: хлорид кальция, жидкая синтетическая среда, *Pseudomonas aeruginosa*

REACTION CALCIUM CHLORIDE EXOPOLYMERIC ALGINATE MATRIX IS FORMED BY STRAINS PSEUDOMONAS AERUGINOSA

¹Malinov E.S., ¹Shestakov A.G., ²Semeonov A.M., ¹Molofeeva N.I., ¹Pulcherovskaya L.P., ¹Karamysheva N.N., ¹Sverkalova D.G., ³Batratkov V.V., Vasilev D.A.

¹Ulyanovsk State Agricultural Academy. a. P.A. Stolypin, Ulyanovsk, e-mail: jenek-malinin@rambler.ru;

²Moscow State University. a. M.V. Lomonosov, Moscow;

³Ulyanovsk State Pedagogical University. a. I.N. Ulyanov, Ulyanovsk

Studied the reaction of calcium chloride solution with exopolymeric alginate matrix formed by strains of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. During the experiment, were used 38 strains of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* including 4 reference strain. Culturing the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* was performed in a liquid synthetic medium in which the matrix is formed exopolymeric and belt-broth. Cultivation was performed in an incubator at 37°C. The results were evaluated every 24 hours within 96 hours. As a result of experiments it was found that by adding a 10% solution of calcium chloride 1 ml of bacterial cult liquid synthetic medium falls white flocculent colloid calcium salts of alginic acids. And when added in a 10% solution of calcium chloride 1 ml of bacterial culture broth belt coming any precipitation was not observed.

Keywords: calcium chloride, liquid synthetic medium, *Pseudomonas aeruginosa*

Альгиновые кислоты впервые были выделены более 100 лет назад из нескольких бурых водорослей. Способностью продуцировать альгиновые кислоты наделены также некоторые бактерии, главным образом представители родов *Azotobacter spp.* и *Pseudomonas spp.* Альгиновые кислоты являются полиуронидами, т.е. полисахаридами, молекулы которых построены из остатков уроновых кислот. В составе альгиновых кислот были найдены D-маннуриновая и L-гулуриновая кислоты. Бактериальные альгиновые кислоты отличаются от водорослевых тем, что часть их гидроксильных групп обычно ацелирована. Альгинатам свойственна такая способность, как гелеобразование. Альгиновые кислоты образу-

ют с одновалентными катионами щелочных металлов растворимые в воде соли, но при подкислении выпадают в осадок. Альгинаты многих двухвалентных катионов металлов, особенно Ca²⁺, Sr²⁺ и Ba²⁺, не растворимы в воде. На этом свойстве основано промышленное выделение альгиновых кислот из водорослей [4].

В промышленности для выделения альгинатов из водорослей применяется метод Грина, суть которого заключается в использовании 10%-го раствора CaCl₂. Раствор хлорида кальция указанной концентрации реагирует с альгиновой кислотой с образованием альгината кальция, формирующий не растворимый в воде хлопьевидный осадок [1].

Бактерии *Pseudomonas aeruginosa* в составе экзополимерного матрикса биопленки содержат альгинаты [7].

Биопленка – это сообщество микроорганизмов, которые прикреплены к поверхности какого-либо субстрата или друг к другу, заключенные в экзополимерный матрикс, синтезированный ими внеклеточными полимерными веществами, имеют измененный фенотип, проявляющийся другими параметрами роста и экспрессией специфических генов [8]. Формирование сообщества микроорганизмов в виде биопленки завершается образованием экзополимерного матрикса – продукта жизнедеятельности бактериальных клеток, основного структурного компонента биопленки, покрывающего ее поверхность и обеспечивающего защиту от неблагоприятных воздействий. Экзополисахариды составляют значительную часть экзополимерного матрикса – 85% массы биопленки. Таким образом, микроорганизмы в биопленке заключены в экзополимерный матрикс, свойства которого определяют взаимоотношения внутриклеточного сообщества и внешней среды [6].

Экспериментальные работы, проведенные нами, показывают, что бактерии *Pseudomonas aeruginosa* способны расти на жидкой синтетической среде с сукцинатом натрия в виде биопленочной формы с образованием альгинатов [2, 3, 5].

Целью данной работы являлось исследование реакции хлорида кальция с экзополимерным альгинатным матриксом, образованным штаммами *Pseudomonas aeruginosa*.

В ходе проведения эксперимента нами было использовано 38 штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, из них 4 референс-штамма (№ 453; 381; 1677; 128) полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «УГСХА им. П.А. Столыпина». В эксперименте использовалась жидкая синтетическая среда, содержащая набор минеральных солей, сукцинат натрия и L-аргинин. Также в эксперименте использовался ГРМ-бульон и 10% раствор CaCl_2 .

Экспериментальная часть

Исследуемые штаммы *Pseudomonas aeruginosa* вносили в пробирки с жидкой синтетической средой и в ГРМ-бульон. Параллельно ставили интактные пробирки с вышеуказанными средами в качестве контроля. Далее пробирки помещали в термо-

стат и культивировали при 37°C в течение 96 часов. Через каждые 24 часа в пробирки с 10 мл 10%-го раствора CaCl_2 вносили по 1 мл суспензии культуры штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и проводили визуальную оценку наличия или отсутствия коллоидного осадка кальциевых солей альгиновых кислот. В пробирках, в которые добавляли 1 мл культуры из ГРМ-бульона, изменений в сравнении с контролем не наблюдали. В пробирках, в которые добавили 1 мл суспензии культуры из жидкой синтетической среды, наблюдали образование белого хлопьевидного коллоида, который медленно опускался на дно пробирки. При внесении 1 мл интактной стерильной жидкой синтетической среды в пробирки с 10%-м раствором CaCl_2 изменений не наблюдали.

Выводы

1. Образование белого хлопьевидного коллоида можно объяснить реакцией между альгиновой кислотой, выделяемой при культивировании биопленки *Pseudomonas aeruginosa* на жидкой синтетической среде с сукцинатом натрия, и 10%-м раствором CaCl_2 , в результате которого образуются кальциевые соли альгиновых кислот, не растворимые в воде.

2. Отсутствие образования белого хлопьевидного коллоида при добавлении 1 мл суточной культуры из ГРМ-бульона в 10%-й раствор CaCl_2 можно объяснить тем, что в данной питательной среде клетки бактерий *Pseudomonas aeruginosa* находятся в планктонном состоянии и не образуют альгинатный экзополимерный матрикс и соответственно биопленку.

Список литературы

1. Кизеветтер И.В. Переработка морских водорослей и других промысловых водных растений / И.В. Кизеветтер, В.С. Грюнер, В.А. Евтушенко. – М.: Пищевая промышленность, 1967. – С. 337–338.
2. Малинов Е.С. Бактериальные биопленки и методы их получения / Е.С. Малинов, А.Г. Шестаков, Д.А. Васильев // Саратов: Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве. – 2012. – 202 с.
3. Малинов Е.С. Влияние уксуснокислого свинца на планктонные и биопленочные формы *Pseudomonas aeruginosa* / Е.С. Малинов, А.Г. Шестаков, Д.А. Васильев // Владимир: Ветеринария и кормление. – 2012. – № 5. – С. 28–30.
4. Усов А.И. Альгиновые кислоты и альгинаты: методы анализа, определения состава и установления строения. – М.: Успехи химии, 1999. – Т. 68(11). – С. 1051–1061.
5. Шестаков А.Г. Среда для стимуляции образования биопленок у бактерий *Pseudomonas aeruginosa*. – М.: Научная жизнь, 2011. – № 5. – С. 22–27.

6. Hentzer M., Teitzel G.M., Balzer G.J., et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function // J. Bacteriol. – 2001. – Vol. 138. – P. 5395–5401.

7. Oglesby L.L. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization / Lashanda L. Oglesby, [et. al.] // Microbiology. – 2008. – № 154. – P. 1605–1615.

8. Tetz V.V. The effect of antimicrobial agents and mutagen on bacterial cells in colonies. Med Microbiol. Lett. – 1996. – № 5. – P. 426–36.

5. Shestakov A.G. Environment for stimulating the formation of biofilms in bacteria *Pseudomonas aeruginosa* // Moscow: SCIENTIFIC LIFE, 2011. no. 5. pp. 22–27.

6. Hentzer M., Teitzel G.M., Balzer G.J., et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function // J. Bacteriol. 2001. Vol. 138. pp. 5395–5401.

7. Oglesby L. L. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization / Lashanda L. Oglesby, [et. al.] // Microbiology. 2008. no. 154. pp. 1605–1615.

8. Tetz V.V. The effect of antimicrobial agents and mutagen on bacterial cells in colonies. Med Microbiol. Lett., 1996; 5: 426–36.

References

1. Kiesewetter I.V. Processing of algae and other aquatic plants fishing / I.V. Kizevetter, V.S. Gryuner, V.A. Evtushenko // Moscow: Food Industry, 1967 pp. 337–338.

2. Malinov E.S. Bacterial biofilms and methods for their preparation / E.S. Malinov, A.G. Shestakov, D.A. Vasiliev // Saratov: Biotechnology: Reality and Perspectives in Agriculture, 2012 pp. 202.

3. Malinov E.S. Effect of lead acetate on planktonic and biofilm forms of *Pseudomonas aeruginosa* / E.S. Malinov, A.G. Shestakov, D.A. Vasiliev // Vladimir: Veterinary Medicine and feeding, 2012. no. 5. pp. 28–30.

4. Usov A.I. Alginic acid and alginates: analytical methods for determining the composition and structure determination // Moscow: Advances Chemistry, 1999 T.68 (11). pp. 1051–1061.

Рецензенты:

Золотухин С.Н., д.б.н., профессор, ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина», г. Ульяновск;

Нафеев А.А., д.м.н., заведующий отделом особо опасных инфекций, природноочаговых инфекций и профилактики туберкулеза, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ульяновской области», г. Ульяновск.

Работа поступила в редакцию 19.12.2014.