

УДК 579.22

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА ANCYLOBACTER ABIEGNUS

¹Кичемазова Н.В., ^{1,2}Бухарова Е.Н., ²Суровцова И.В., ¹Карпунина Л.В.

¹ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»,
Саратов, e-mail: natali8519@mail.ru;

²ООО «Научно-инновационная компания «Викдог», г.Саратов, e-mail: nic.vicdog@mail.ru

Изучены биологические свойства экзополисахарида (ЭПС) бактерии *Ancylobacter abiegnus* Z-0056 (анцилана). Исследовано влияние ЭПС на микроорганизмы естественного местообитания *Ancylobacter abiegnus* (*Singulisphaera mucilaginoso* Z-0071, *Xanthobacter xylophilus* Z-0055) и на тест-штаммы микроорганизмов (*Pseudomonas aeruginosa* 27533, *Escherichia coli* 01, *Staphylococcus aureus* 209, *Bacillus cereus* 8035, *Candida albicans* 230). Показано, что исследуемый экзополисахарид в концентрации 1 г/л оказывает положительное влияние на рост некоторых бактерий, в том числе и продуцента – *Ancylobacter abiegnus* Z-0056. Исследовали влияние ЭПС на клетки инфузорий *Colpoda stenii* [5] и лабораторных животных (белые мыши). Согласно полученным данным, можно предположить, что бактерии *A. abiegnus* Z-0056 продуцируют экзополисахарид с целью защиты от поедания простейшими, а также как запасное питательное вещество.

Ключевые слова: экзополисахарид, бактерии-диссипотрофы, биологические свойства, токсичность

BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE ANCYLOBACTER ABIEGNUS EXOPOLYSACCHARIDE

¹Kichemazova N.V., ^{1,2}Bukharova E.N., ²Surovtsova I.V., ¹Karpunina L.V.

¹Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Saratov, e-mail: natali8519@mail.ru;

²Research & Innovation Company «Vicdog», Saratov, e-mail: nic.vicdog@mail.ru

The biological properties of the exopolysaccharide (EPS) of the *Ancylobacter abiegnus* Z-0056 bacteria (ancylan) were studied. The influence of this EPS on the natural-habitation microorganisms *Ancylobacter abiegnus* (*Singulisphaera mucilaginoso* Z-0071, *Xanthobacter xylophilus* Z-0055) and on test strains of several microorganisms (*Pseudomonas aeruginosa* 27533, *Escherichia coli* 01, *Staphylococcus aureus* 209, *Bacillus cereus* 8035, and *Candida albicans* 230) was explored. The exopolysaccharide under study in a concentration of 1 g/L was shown to render positive effect on the growth of some bacteria, including the producer itself (*Ancylobacter abiegnus* Z-0056). The influence of the EPS on the cells of *Colpoda stenii* infusorians [5] and laboratory animals (white mice) was studied. According to our data, it can be supposed that the *A. abiegnus* Z-0056 bacteria produce their exopolysaccharide for protection from being eaten by protozoa and as a reserve nutrient.

Keywords: exopolysaccharide, dissipotrophic bacteria, biological properties, toxicity

В последние годы экзополисахариды микробного происхождения привлекают внимание многих исследователей. Микробные ЭПС находят применение в ветеринарии, медицине, фармацевтической, пищевой, химической, нефтедобывающей и других отраслях, поскольку обладают широким спектром физико-химических, функционально-технологических и биологических свойств [2, 13, 14]. В связи с этим поиск новых продуцентов микробного происхождения и всестороннее их изучение представляется актуальной задачей в современной микробиологии и биотехнологии.

Целью работы явилось изучение некоторых биологических свойств ЭПС *Ancylobacter abiegnus* Z-0056.

Материалы и методы исследований

Объектом исследований явился экзополисахарид, впервые выделенный из культуральной жидкости диссипотрофной бактерии *Ancylobacter abiegnus* Z-0056, названный нами анциланом [11]. Бактерии *Ancylobacter abiegnus* Z-0056 были предоставлены сотрудниками лаборатории реликтовых микробных

сообществ Института микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН [8]. Этот микроорганизм выделен из ультрапресных кислых дистрофных вод гниющей древесины ели Северных болот России. Диссипотрофы вносят весомый вклад в круговорот углерода в экосистеме. Они участвуют в начальной стадии разложения древесины, где концентрация легкодоступных питательных веществ невысока [8].

ЭПС выделяли по общепринятой методике [3] в нашей модификации.

Влияние ЭПС на рост бактерий и грибов изучали методами серийных разведений и диффузии в агар [10,14]. Для проведения эксперимента использовали культуры бактерий сходных местообитаний: *Singulisphaera mucilaginoso* Z-0071 и *Xanthobacter xylophilus* Z-0055, полученные из лаборатории реликтовых микробных сообществ Института микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН [8], а также тест-штаммы бактерий *Pseudomonas aeruginosa* 27533, *Escherichia coli* 01, *Staphylococcus aureus* 209, *Bacillus cereus* 8035 и грибов *Candida albicans* 230, полученные из музея микроорганизмов кафедры микробиологии, биотехнологии и химии Саратовского государственного аграрного университета им. Н.И. Вавилова.

Токсичность ЭПС определяли по влиянию на клетки инфузорий *Colpoda stenii* [5] и лабораторных

животных (белые мыши). Инфузории и мыши были получены из Пензенской областной ветеринарной лаборатории.

Исследования проводили на здоровых самцах белых беспородных мышей в возрасте 1–1,5 месяца со средней массой тела массой 22–25 г. Перед началом эксперимента выдерживали карантин – 21 день. Лабораторных животных содержали по общепринятым методикам [1]. Общий и биохимический анализы крови исследовали с помощью автоматического гематологического анализатора «РепсVet». Вскрытие, патоморфологическую диагностику и гистологические исследования проводили по методике Г.А. Меркулова [12]. Количество бактерий в кишечнике экспериментальных животных определяли методом серийных

разведений [14]. Для культивирования бактерий использовали среды КАНАФАНМ и лактобакагар.

Результаты исследований и их обсуждение

При изучении влияния анцилана на рост бактерий было обнаружено, что добавление его в концентрации 1 г/л в питательную среду усиливает рост бактерий сходных местообитаний, таких, как *Singulisphaera mucilaginoso* Z-0071, а также и самого продуцента данного ЭПС–*A.abiegnus* Z-0056 (табл. 1).

Таблица 1

Влияние экзополисахарида *A.abiegnus* Z-0056 на рост микроорганизмов сходных местообитаний

Штамм	D, ($\lambda=425$ нм), без добавления ЭПС	D, ($\lambda=425$ нм), с добавлением ЭПС	Результат
<i>S. mucilaginoso</i> Z-0071	0,295	0,353	Усиление роста
<i>A. abiegnus</i> Z-0055	0,551	0,574	Усиление роста
<i>X. xylophilus</i> Z-0055	0,379	0,374	Не влияет на рост

Положительное влияние в концентрациях 0,25 г/л, 0,5 г/л и 1 г/л анцилан оказывал и на рост некоторых других бактерий, в частности, *Pseudomonas aeruginosa* 27533. В то же время на рост таких микроорга-

низмов, как *Xanthobacter xylophilus* Z-0055, *Escherichia coli* 01, *Staphylococcus aureus* 209, *Bacillus cereus* 8035, *Candida albicans* 230, в этих же концентрациях данный ЭПС влияния не оказывал (табл. 1, 2).

Таблица 2

Влияние экзополисахарида *A. abiegnus* Z-0056 на рост тест-культур микроорганизмов

Концентрация ЭПС	Микроорганизмы	Зона усиления роста вокруг лунки, мм
0,25 г/л	<i>E. coli</i> 01	-
	<i>S. aureus</i> 209	-
	<i>P. aeruginosa</i> 27533	3
	<i>B. cereus</i> 8035	-
	<i>C. albicans</i> 230	-
0,5 г/л	<i>E. coli</i> 01	-
	<i>S. aureus</i> 209	-
	<i>P. aeruginosa</i> 27533	5
	<i>B. cereus</i> 8035	-
	<i>C. albicans</i> 230	-
1 г/л	<i>E. coli</i> 01	-
	<i>S. aureus</i> 209	-
	<i>P. aeruginosa</i> 27533	10
	<i>B. cereus</i> 8035	-
	<i>C. albicans</i> 230	-

Примечание: «-» не наблюдали усиления роста

Добавление данного биополимера в концентрации 1 г/л в культуру инфузорий (*Colpoda stenii*) приводило первоначально (через 3 минуты) к их хаотичному движению (табл. 3). С пятой минуты наблюдали замедление движения отдельных клеток. Через 10 минут в поле зрения появлялись мертвые клетки. Через 30 минут наступала гибель 100 % инфузорий. Через 50 минут в поле зрения наблюдали только фрагмен-

ты клеток. В то время как в контроле (инфузории, находящиеся в физиологическом растворе без ЭПС) клетки инфузорий двигались спокойно и оставались живыми в течение всего эксперимента (3 часа). Следовательно, ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 в данной концентрации токсичен для инфузорий, поскольку согласно ГОСТ [5] токсичным считается препарат, если гибель инфузорий наступает в интервале от 10 минут до 3 часов.

Таблица 3

Действие экзополисахарида *A. abiegnus* Z-0056 на инфузории

Время, мин	Поведение инфузорий	
	с ЭПС (опыт)	без ЭПС (контроль)
3	Активное хаотичное движение	Спокойное движение
5	Замедление движения	Спокойное движение
10	Замедленное движение, некоторые клетки мертвые	Спокойное движение
30	100% мертвых клеток	Спокойное движение
40	10% мертвых клеток 90% разрушенных клеток	Спокойное движение
50	В поле зрения только фрагменты клеток	Спокойное движение

Исходя из приведенных данных, можно предположить, что исследуемый бактериальный ЭПС в природе играет роль источника питания для некоторых микроорганизмов, включая бактерии-продуценты этого биополимера. Это свойство встречается у олиготрофных бактерий, растущих в условиях дефицита питательных веществ [4]. Токсичность анцилана для инфузорий позволяет говорить о его защитной роли – ЭПС способствует защите бактерий от поедания простейшими в естественной среде обитания.

С целью оценки перспектив возможного применения анцилана были проведены испытания на лабораторных животных. Исследование токсичности ЭПС на лабораторных мышках проводили для оценки степени опасности однократного перорального введения малой и относительно высокой доз – 0,06 и 3 г на 1 кг массы тела животного соответственно. Животные были разделены на 3 группы: 1 группа – контрольная, получавшая физиологический раствор в объеме 1 мл; 2 группа мышшей получала анцилан в дозе 0,06 г/кг в объеме 1 мл; 3 группа – получала анцилан в дозе 3,00 г/кг в объеме 1 мл. ЭПС и физиологический раствор вводили в организм мышшей перорально через катетер натошак. Наблюдения за животными проводили в течение трех суток. В ходе эксперимента осуществ-

ляли контроль динамики массы животных. По окончании периода наблюдений всех животных контрольной и опытных групп подвергли эвтаназии с соблюдением принципов эвтаназии (применение эфирного наркоза), производили вскрытие и определение морфометрических характеристик внутренних органов. Также производили забор содержимого толстого кишечника животных и проводили посев содержимого на чашки Петри со средами для подсчета общего микробного числа бактерий (среда КАМАФАНМ), для молочнокислых бактерий (лактобакагар). Бактерии культивировали в термостате при 37°C в течение трех суток.

Были получены следующие результаты.

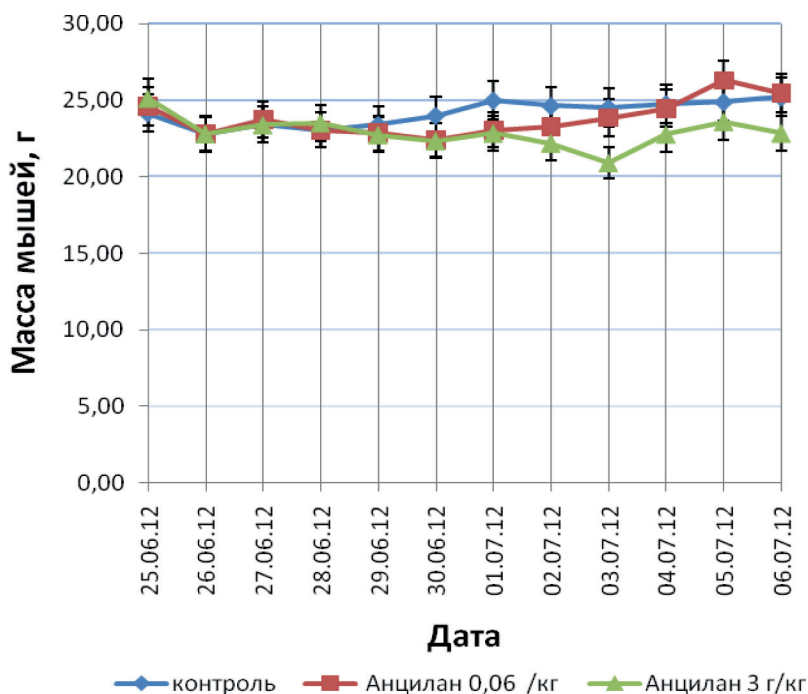
В 1-й группе (контрольной) на протяжении трех суток после введения раствора ЭПС мыши были активны, поведение соответствовало норме. Признаки интоксикации отсутствовали.

Во 2-й группе, получавшей анцилан в дозировке 0,06 г/кг, поведение животных в ходе эксперимента было угнетенным в течение двух суток, затем постепенно приходило в норму, но иногда проявлялись признаки агрессии.

В 3-й группе, получавшей ЭПС в дозировке 3 г/кг, наблюдалось поведение, сходное с поведением мышшей 2-й группы. Летальных случаев не наблюдали.

В течение эксперимента не выявлено существенных различий в динамике массы опытных и контрольных животных. Это свидетельствует о том, что на данном

временном отрезке пероральное поступление бактериального экзополисахарида в организм животных не отражалось на их росте.



Влияние ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 на массу мышей

Было проведено визуальное изучение, а также сравнительное исследование гистологических срезов печени, почек и сердца животных контрольной и опытных групп. Согласно полученным результатам, внешний вид, размеры и состояние тканей внутренних органов мышей контрольной группы соответствовали показателям клинически здоровых животных. У мышей 3-й группы, получавшей ЭПС в дозировке 3 г/кг, наблюдали изменения в структуре тканей. Так, визуально наблюдали увеличение размера печени по сравнению с контролем. Тканевый материал печени, полученный от 3-й группы, имел более бледную и неоднородную окраску по сравнению с контролем, клетки органа более крупные. Внешний вид почек у животных опытных групп не изменен по сравнению с контролем, однако в тканевом материале, взятом от животных 3-й группы, в цитоплазме клеток видны разных размеров вакуоли, наполненные жидкостью. Внешний вид сердца не изменен по сравнению с контролем. На гистологических срезах сердца мышей 3-й группы наблюдали поверхностную дезорганизацию

соединительной ткани (мукоидное набухание). Описанные изменения наблюдали и у животных 2-й группы, однако они были слабо выражены.

Таким образом, результаты визуальных наблюдений и гистологических исследований внутренних органов лабораторных мышей, получавших ансилан перорально, показывают влияние больших доз ЭПС на лимфо- и кровообращение. В малых дозах это влияние менее выражено.

В опытных группах животных наблюдали изменения некоторых показателей крови (табл. 4). Так, происходило повышение общего содержания белка в 1,1 и 1,5 раза во второй и третьей группе соответственно. Предположительно это было вызвано обезвоживанием организма [9]. Содержание билирубина возрастало во 2 группе в 1,4 раза, в 3 группе в 1,6 раза, что может быть связано с лизисом эритроцитов. Это подтверждается снижением общего количества эритроцитов, что, в свою очередь, объясняет нарушение окраски печени. Вероятно, негативное действие ЭПС на организм животного было вызвано прежде всего его способностью связывать воду.

Таблица 4

Влияние анцилана на некоторые показатели крови мышей

ЭПС	Показатели крови					
	Били- рубин, мкмоль/л	P	Белок, г/л	P	Количе- ство эри- троцитов, ×10 ⁹ /л	P
Анцилан 0,06 г/кг	6,10±0,30	<0,05	64,30±3,20	<0,05	7,57±0,30	<0,05
Анцилан 3,0 г/кг	6,90±0,30	<0,05	83,60±4,10	<0,05	7,21±0,30	<0,05
Контроль	4,30±0,17	-	56,20±2,80	-	8,00±0,40	-

Таким образом, эксперименты на лабораторных животных (мыши) показали практическую безвредность анцилана при условии соблюдения дозы. По сравнению с ЭПС ксилофиланом, полученным нами ранее из культуральной жидкости диссипотрофной бактерии *Xanthobacter xylophilus* Z-0055 [4], анцилан не является токсичным веществом.

При исследовании влияния анцилана на микрофлору кишечника мышей было

обнаружено, что при концентрации ЭПС 0,06 г/кг происходило уменьшение общего микробного числа (ОМЧ) в 3,5 раза по сравнению с контролем и увеличение числа молочнокислых бактерий в 5 раз (табл. 5). При введении анцилана в организм мышей в концентрации 3 г/кг наблюдали как увеличение ОМЧ, так и увеличение количества молочнокислых бактерий в 1,1 и 80 раз соответственно по сравнению с контролем.

Таблица 5

Влияние анцилана на микрофлору толстого кишечника мышей

ЭПС	ОМЧ, ×10 ¹¹	P	Количество молочнокислых бактерий, ×10 ⁹	P
Анцилан, 0,06 г/кг	2,00±0,09	<0,05	5,00±0,20	<0,05
Анцилан, 3 г/кг	8,00±0,35	<0,05	80,00±3,25	<0,05
Контроль	7,00±0,30	-	1,00±0,05	-

Из представленных данных видно, что пероральное введение анцилана способствует увеличению количества молочнокислых бактерий в организме животных (мышей), что наблюдается и при воздействии некоторых других бактериальных ЭПС, как было показано нами ранее [4, 6].

Согласно полученным данным, можно предположить, что бактерии *A. abiegnus* Z-0056 продуцируют экзополисахарид с целью защиты от поедания простейшими, а также как запасное питательное вещество. После проведения дополнительных исследований анцилан может найти свое применение в ветеринарии, например, как противопротозойное средство для животных.

Список литературы

1. Башенина Н.В. Руководство по содержанию и разведению новых в лабораторной практике видов мелких грызунов. – М.: Изд-во Московского ун-та, 1975. – 166 с.

2. Беседнова Н.Н., Иванушко Л.А., Звягинцева Т.Н., Елякова Л.А. Иммунотропные свойства 1→3; 1→6-β-D-глюкоанов // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – №2. – С. 37–44.

3. Бухарова Е.Н. Экзополисахарид *Raenibacillus polytuxa* 88А: получение, характеристика и перспективы использования в хлебопекарной промышленности: дисс.... канд. биол. наук. – Саратов, 2004. – 189 с.

4. Бухарова Е.Н., Кичемазова Н. В., Бухарова И.А., Суrowцова И.В., Карпунина Л.В. Исследование биологических свойств экзополисахарида *Xanthobacter xylophilus*// Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2013. – №2. – С. 11–14.

5. ГОСТ Р 52337–2005. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности.

6. Денисова М. Н., Рысмухамбетова Г. Е., Бухарова Е. Н., Суrowцова И. В., Карпунина Л.В. Изучение влияния экзополисахарида *Xanthomonas campestris* на организм лабораторных животных //Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве: мат. Межд. науч.-практ. конф. (28–29 января 2013 г.). – Саратов, 2013. – С. 184–185.

7. Ермольева З.В., Вайсберг Г.Е. Стимуляция неспецифической резистентности организма и бактериальные полисахариды. – М.: Медицина, 1976. – 184 с.

8. Зайчикова М.В., Берестовская Ю.Ю., Васильева Л.В. Диссипотрофные бактерии ксилотрофного сообщества в пресноводных экосистемах //Актуальные аспекты современ-

ной микробиологии: V Молодежная школа–конференция с международным участием. – М., 2009. – С. 77–78.

9. Кесарева Е.А., Денисенко В.Н. Клиническая интерпретация биохимических показателей сыворотки крови собак и кошек. – М.: КолосС, 2011. – 28 с.

10. Карпунина Л.В., Мельникова У.Ю., Сулова Ю.В., Мухачева Е.С., Игнатов В.В. Бактерицидные свойства лектинов азотфиксирующих бацилл //Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 3. – С. 343–347.

11. Кичемазова Н.В., Жемеричкин Д.А., Бухарова Е.Н., Берестовская Ю.Ю., Васильева Л.В., Карпунина Л.В. // Химия и биохимия углеводов: мат. IV Всеросс. школы–конференции (Саратов, 14–16 сентября 2011 г.). – Саратов: ООО «Ракурс», 2011. – С. 60–61.

12. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники. – Л.: Медгиз, 1956. – С. 263.

13. Руководство по медицинской микробиологии. Общая санитарная микробиология. Книга 1; под ред. А. С. Лабинской, Е.Г. Волиной. – М.: БИНОМ; – 2008.–1080 с.

14. Arena A., Maugeri T.L., Pavone B., Iannello D., Gugliandolo C., Bisignano G. Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis* // Int. Immunopharmacol. – 2006. – V. 6. – P. 8–13.

References

1. Bashenina, N.V. Rukovodstvo po sodержaniyu i razvedeniju novyh v laboratornoj praktike vidov melkih gryzunov. – Moskva: Izd–vo Moskovskogo un–ta, 1975. – p. 166.

2. Besednova N.N., Ivanushko L.A., Zvjaginceva T.N., Eljakova L.A. Immunotropnye svojstva 1→3; 1→6–β-D–gljukanov // Antibiotiki i himioterapija. – 2000. – no. 2. – pp. 37–44.

3. Buharova E.N. Jezkopolisaharid Paenibacillus polymyxa 88A: poluchenie, harakteristika i perspektivy ispol'zovanija v hlebopekarnoj promyshlennosti: diss.... kand. biol. nauk. – Saratov. 2004. – p. 189.

4. Buharova E.N., Kichemazova N. V., Buharova I.A., Surovcova I.V., Karpunina L.V. Issledovanie biologicheskikh svojstv jezkopolisaharida *Xanthobacter xylophilus*// Vestnik Saratovskogo gosagrouniversiteta im. N.I. Vavilova. – 2013. – no. 2. – pp. 11–14.

5. GOST R 52337–2005. Korma, kombikorma, kombikormovoe syr'e. Metody opredelenija obshhej toksichnosti.

6. Denisova M. N., Rysmuhambetova G. E., Buharova E. N., Surovcova I. V., Karpunina L.V. Izuchenie vlijanija jezkopolisaharida *Xanthomonas campestris* na organizm laboratornyh zhivotnyh //Biotehnologija: real'nost' i perspektivy

v sel'skom hozjajstve: Mat. Mezhd. nauch.–prakt. konf. 28–29 janvarja 2013 g., Saratov,2013. –pp. 184–185.

7. Ermol'eva Z.V., Vajsberg G.E. Stimuljacija nespecificheskoj rezistentnosti organizma i bakterial'nye polisaharidy. – М.: Medicina, 1976. – p. 184.

8. Zajchikova M.V., Berestovskaja Ju.Ju., Vasil'eva L.V. Dissipotrofnye bakterii ksilotrofnogo soobshhestva v presnovodnyh jekosistemah //Aktual'nye aspekty sovremennoj mikrobiologii: V Molodezhnaja shkola–konferencija s mezhdunarodnym uchastiem. – Moskva, 2009. – pp. 77–78.

9. Kesareva E.A., Denisenko V.N. Klinicheskaja interpretacija biohimicheskikh pokazatelej sivorotki krovi sobak i koshek – М.:KolosS,2011. – pp. 28.

10. Karpunina L.V., Mel'nikova U.Ju., Suslova Ju.V., Muhacheva E.S., Ignatov V.V. Baktericidnye svojstva lektinov azotfiksirujushhih bacill //Mikrobiologija. – 2003. –Т. 72, no. 3. –pp. 343–347.

11. Kichemazova N.V., Zhemerichkin D.A., Buharova E.N., Berestovskaja Ju.Ju., Vasil'eva L.V., Karpunina L.V. // Himija i biohimija uglevodov: Mat.konf. IV Vserossijskaja shkola–konferencija. Saratov, 14–16 sentjabrja 2011. – Saratov: ООО «Rakurs», 2011. – pp. 60–61.

12. Merkulov G.A. Kurs patologistologicheskoy tehniki. L.: Medgiz., 1956. – p. 263.

13. Rukovodstvo po medicinskoj mikrobiologii. Obshhaja sanitarnaja mikrobiologija. Kniga 1./ Pod red. A. S. Labinskoy, E. G. Volinoj. Moskva: BINOM. –2008.– p. 1080.

14. Arena A., Maugeri T.L., Pavone B., Iannello D., Gugliandolo C., Bisignano G. Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis* // Int. Immunopharmacol. –2006. –V. 6. – pp. 8–13.

Рецензенты:

Швиденко И.Г., д.м.н., профессор, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского», г. Саратов;

Тихомирова Е.И., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой экологии ФГОУ ВПО «Саратовский государственный технический университет имени Ю.А. Гагарина», г. Саратов.

Работа поступила в редакцию 04.06.2014.