

ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА КАТАЛАЗНУ АКТИВНІСТЬ ШТАМУ *CORYNEBACTERIUM AMMONIAGENES* УКМ АС-732

Досліджено вплив складу середовища та умов культивування на каталазну активність *Corynebacterium ammoniagenes* УКМ Ас-732 у динаміці росту культури. Цей штам виявляє найбільшу каталазну активність у ранній логарифмічній фазі. Встановлено, що каталазна активність культури, вирощеної у рідких живильних середовищах, є вищою, ніж за умов культивування на щільних живильних середовищах. Крім того виявлено, що як надлишок кисню, так і його нестача викликають підвищення активності цього ферменту у непатогенних коринебактерій.

Ключові слова: непатогенні коринебактерії, каталазна активність, умови культивування, динаміка росту.

Вступ

У природних умовах бактерії як аеробні, так і факультативно анаеробні постійно зазнають впливу активних форм кисню, що утворюються як побічні продукти у результаті метаболічних реакцій. За нормальних умов організм здатен контролювати рівень згаданих сполук у клітині та знешкоджувати їх надлишок за участі різноманітних антиоксидантних систем. З іншого боку, різні стресові чинники порушують рівновагу між процесами утворення та детоксикації активних форм кисню, що, в свою чергу, призводить до виникнення так званого оксидативного стресу.

Відомо, що вагома роль у процесах антиоксидантного захисту у бактерій належить каталазі. На сьогодні накопичено чимало відомостей про цей фермент, зокрема, з'ясовано особливості його будови, властивості, шляхи індукції. Однак зазначену інформацію одержано на очищених препаратах каталази, хоча очевидним є той факт, що властивості ферментів за умов *in vivo* та *in vitro* суттєво відрізняються. Крім того, згадана інформація стосується переважно бактерій, систематично віддалених від представників роду *Corynebacterium*, наприклад таких, як *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* та ін. Натомість бактеріальні каталази грампозитивних бактерій, а саме коринебактерій, вивчені недостатньо.

Отже, метою нашої роботи було дослідити каталазну активність інтактних клітин *Corynebacterium ammoniagenes* у динаміці росту за різних умов культивування, що передбачало вирощування коринебактерій на середовищах різного складу, консистенції та різного ступеня аерації. Непатогенні коринебактерії було обра-но нами як об'єкт дослідження з огляду на те,

що вони є систематично віддаленими від грампозитивних бактерій, грампозитивними факультативно анаеробними мікроорганізмами, характеризуються специфічним циклом розвитку кок-паличка-кок. Крім того, вони широко розповсюджені у природі як складова нормальної мікрофлори людини і тварин, входять до складу природних біоценозів, а також є продуцентами різноманітних метаболітів у мікробіологічних виробництвах. Характерним для цієї групи бактерій також є те, що значний відсоток представників роду *Corynebacterium* здатні викликати інфекційні захворювання людини і тварин, наприклад *Corynebacterium diphtheriae*. Тому вивчення особливостей каталазної активності досліджуваних нами бактерій за умов *in vivo* допоможе з'ясувати можливі механізми захисту від антибіотиків, дія яких пов'язана з генерацією оксидативного стресу [1].

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження був штам коринебактерій *Corynebacterium ammoniagenes* УКМ Ас-732 (=АТСС 6871^{Тm}, Тип – штам, типовий для виду), отриманий з Української колекції мікроорганізмів (УКМ) Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Для побудови кривої росту штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732 використовували загальноживане рідке середовище м'ясопептонний бульйон (МПБ, Himedia, Індія) та рідке живильне середовище для культивування коринебактерій 53 [2] такого складу (%): триптон (Difco, США) – 1, дріжджовий екстракт (Difco, США) – 0,5, NaCl (Merck, Німеччина) – 0,5, глюкоза – 5. Культуру бактерій вирощували у круглодонних колбах за співвідношення об'єму живильного

середовища до об'єму колби ($V_{\text{сер}}/V_{\text{кол}}$) 2:5 і температури 30 °С за умов постійного перемішування (250 об./хв). Живильне середовище інокулювали шляхом внесення стандартизованої суспензії добової культури коринебактерій, концентрацією 1×10^9 клітин/мл, у кількості 5 % від загального об'єму середовища. Суспензію клітин стандартизували, застосовуючи денситометр для вимірювання оптичної густини DEN-1 (Biosan, Латвія). Для синхронізації культури колби з живильним середовищем після інокуляції бактеріями витримували за +4 °С протягом 30 хв. Про нарощення біомаси бактеріальної культури судили за підвищенням оптичної густини культуральної рідини (КР), яку вимірювали на Spocol-11 (Німеччина) за довжини хвилі 600 нм. Вимірювання оптичної густини КР проводили кожні 30 хвилин до моменту виходу культури у логарифмічну фазу, а після настання експоненціальної фази виміри проводили кожні 3 години. В якості контролю при вимірюванні використовували середовище культивування.

Вплив складу середовища культивування на каталазну активність коринебактерій вивчали шляхом вирощування культури на рідких (МПБ і 53) та щільних (МПА та 53 агаризоване) живильних середовищах.

Моделювання умов аерації здійснювали шляхом зміни співвідношення об'єм середовища/об'єм колби 1:5 та 2:5 за постійного перемішування 250 об./хв і температури 30 °С. Глибинне культивування проводили за вищезазначених умов, але без постійного перемішування.

Каталазну активність у стандартизованій суспензії інтактних клітин визначали спектрофотометрично (СФ-46, ЛОМО, Ленінград) за довжини хвилі 240 нм за розкладом перексиду водню. Активність каталази визначали у реакційному середовищі об'ємом 3 мл, яке містило 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,4), 0,5 мМ ЕДТА

(Sigma, США), 10 мМ перексиду водню та 50 мкл суспензії клітин. Для обрахунку вмісту H_2O_2 використовували коефіцієнт молярної екстинції $39,4 (\text{M}\cdot\text{cm})^{-1}$ [3]. Каталазну активність виражали у мкмоль/хв на 1 мл стандартизованої суспензії, концентрацією 1×10^9 клітин/мл. Дослідження ферментативної активності проводили за температури 27 °С. Результати дослідження обробляли статистично за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу. Достовірність різниці між середніми значеннями різних вибірок оцінювали, використовуючи критерій Ньюмена-Кейлса. Рівень значущості $\alpha = 0,05$.

Результати та їх обговорення

Відомо, що мікроорганізмам притаманна висока адаптаційна здатність до умов довкілля. Тому логічно було припустити, що умови культивування, насамперед хімічний склад середовища та його консистенція, суттєво впливатимуть на фізіологічний стан культури та її метаболізм. Зазначену закономірність було відмічено іншими авторами при дослідженні грамнегативних бактерій, зокрема *Bacteroides distasonis* [4].

На першому етапі роботи нами були досліджені закономірності росту штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732 під час вирощування у загальноживаному рідкому середовищі МПБ та середовищі 53, спеціально створеному для культивування цієї групи мікроорганізмів. Як свідчать отримані результати, незалежно від складу середовища штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732 проходив усі стадії розвитку, типові для представників цього роду. Разом із тим зміна складу середовища призводила до деяких відмінностей у динаміці росту цієї культури (рис. 1). Так, лаг-фаза на обох досліджених середовищах була однаковою і тривала 6 годин. За культивування у середовищі 53, порівняно з МПБ, спостеріга-

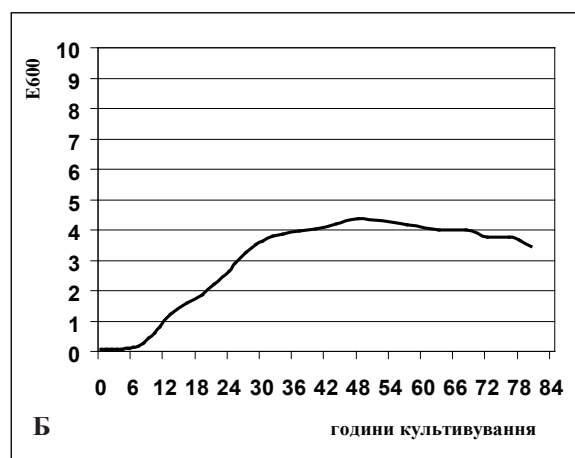
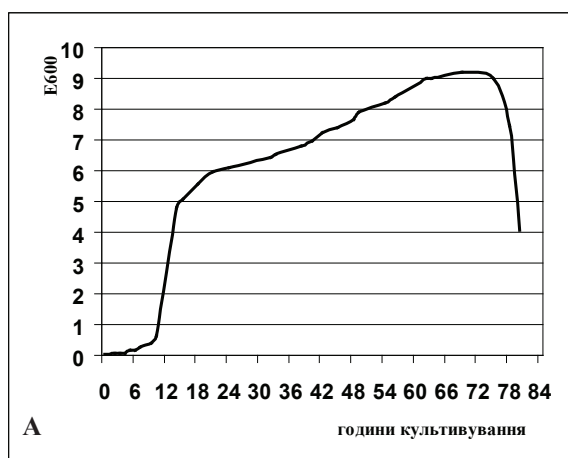


Рис. 1. Динаміка росту *Corynebacterium ammoniagenes* УКМ Ас-732 за культивування у середовищі для коринебактерій 53 (А) та м'ясопептонному бульйоні (Б)

лося скорочення на 6 годин логарифмічної фази. Тривалість стаціонарної фази на обох середовищах була практично однаковою (зокрема, у МПБ – з 31-ї по 70-ту, а у середовищі 53 – з 25-ї по 70-ту години культивування). На 70 - 72-й годині вирощування у дослідженого штаму реєстрували початок фази відмирання культури. Натомість, суттєвішу різницю було виявлено за інтенсивністю нагромадження біомаси, яку реєстрували за зміною оптичної густини КР. Даний показник за культивування у середовищі 53 був практично вдвічі вищим, порівняно із МПБ.

Отримані дані дозволили нам визначити чотири основні точки, що репрезентують стадії розвитку штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732, зокрема, фазу прискореного росту (9-та година культивування), фазу сповільненого росту (24-а година культивування), стаціонарну фазу (48-ма година культивування) та фазу відмирання культури (72-га година культивування). У подальшому саме ці часові проміжки було використано нами для визначення рівня каталазної активності у динаміці росту культури.

Дані літератури засвідчують, що ферментативна активність мікроорганізмів істотно залежить від фази розвитку культури і може змінюватись впродовж росту бактерій. Найбільша активність ферментів, зазвичай, спостерігається у фазі експоненціального росту. Разом із тим показано, що пік активності каталази у різних мікроорганізмів може припадати на різні стадії розвитку культури. Так, у *Bacillus subtilis* пік активності каталази 1 припадає на логарифмічну фазу росту, тоді як у *Streptomyces coelicolor* – на стаціонарну фазу [5, 6].

У результаті дослідження каталазної активності штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732 нами було встановлено (рис. 2), що найвищий рівень активності цього ферменту, незалежно від складу середовища, спостерігається у клітин фазі прискореного росту, тобто саме тоді, коли культура характеризується найвищою біосинтетичною активністю. Даний показник становив 1950 і 1522 мкМ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{хв}$ на 10^9 кл. на середовищах 53 і МПБ, відповідно. На пізніших стадіях росту відбувалося зниження рівня активності цього ферменту, порівняно з ранньою логарифмічною фазою. Разом із тим під час переходу культури від фази сповільненого росту у стаціонарну ферментативна активність суттєво не змінювалась і для обох досліджених середовищ в середньому становила 1400 мкМ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{хв}$ на 10^9 кл. Найменшу каталазну активність інтактних клітин коринібактерій було зареєстровано у фазі відмирання (1060 мкМ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{хв}$ на 10^9 кл. – за культивування у середовищі 53 та 1286 мкМ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{хв}$ на 10^9 кл. – у МПБ, відповідно).

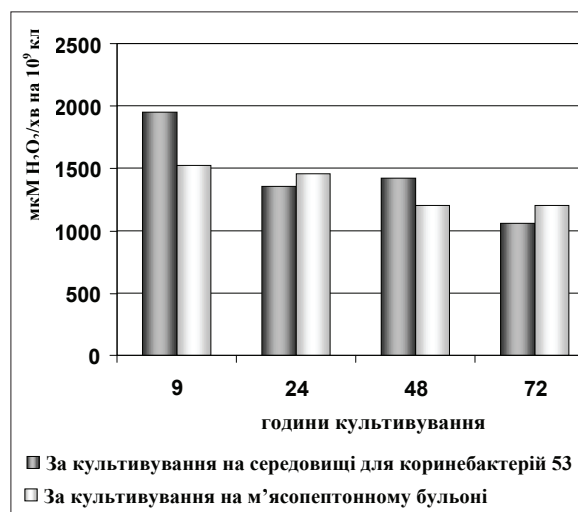


Рис. 2. Зміни каталазної активності штаму *Corynebacterium ammoniagenes* УКМ Ас-732 на різних фазах розвитку культури залежно від складу середовища

Таким чином, було встановлено, що рівень каталазної активності штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732 залежить не лише від стадії розвитку культури, а й складу живильного середовища, причому на середовищі 53 ця залежність виражена яскравіше.

Наступним етапом наших досліджень було вивчення каталазної активності штаму *C. ammoniagenes* за умов культивування на щільних живильних середовищах – агаризованому середовищі 53 та м'ясопептонному агарі (МПА). Зважаючи на те, що 24-а, 48-ма та 72-га години культивування репрезентують основні стадії розвитку культури, а 9-та година викликає певні технічні труднощі, надалі дослідження каталазної активності здійснювали у вищезазначених трьох точках.

Вивчення каталазної активності під час росту штаму *C. ammoniagenes* на агаризованих живильних середовищах дозволило з'ясувати, що вона була вищою, порівняно із активністю культури, яку вирощували у рідких живильних середовищах. Крім того, рівень каталазної активності за умови вирощування штаму *C. ammoniagenes* на щільному середовищі 53 був вищим, ніж за культивування на МПА незалежно від стадії росту (табл. 1).

Порівняння рівня каталазної активності за умов культивування у рідких та щільних живильних середовищах (як м'ясопептонному, так і середовищі 53) дозволило з'ясувати, що хімічний склад живильного середовища та його консистенція виявляють суттєвий вплив на цей фермент у штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732.

Зважаючи на отримані результати, було зроблено припущення, що підвищення рівня каталазної активності за умов культивування на ага-

Таблиця 1. Вплив складу середовища на каталазну активність штаму *Corynebacterium ammoniagenes* УКМ Ас-732

Фаза розвитку культури, (година культивування)	Каталазна активність коринебактерій за культивування на:			
	середовищі для коринебактерій 53		м'ясопептонному середовищі	
	агаризоване	рідке	агаризоване	рідке
Пізня логарифмічна фаза (24-та год)	2127 ± 58 n = 23	1353 ± 125 n = 12	1816 ± 41 n = 15	1400 ± 40 n = 9
Стаціонарна фаза (48-ма год)	1842 ± 60 n = 18	1419 ± 71 n = 11	1648 ± 41 n = 9	1374 ± 58 n = 10
Фаза відмирання культури (72-га год)	1848 ± 56 n = 16	1060 ± 141 n = 8	1642 ± 58 n = 12	1286 ± 48 n = 6

ризованих середовищах може бути зумовлене більшим контактом культури з киснем. Тому, вважали за доцільне дослідити рівень активності даного ферменту за постійного перемішування й різного ступеня насиченості середовища киснем. Згадані умови моделювали шляхом зміни співвідношення об'єм середовища/об'єм колби ($V_{\text{сер.}}/V_{\text{кол.}}$), яке, відповідно, становило 1:5 та 2:5.

Нами було з'ясовано, що під час росту за умов постійного перемішування за співвідношення $V_{\text{сер.}}/V_{\text{кол.}}$ 2:5 каталазна активність штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732 на 24 і 48 години культивування практично не відрізнялась і становила 1353 та 1419 мкМ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{хв}$ на 10^9 кл., відповідно, та зменшувалась на 72-гу годину культивування (рис. 3).

Підвищення ступеня насиченості середовища культивування киснем ($V_{\text{сер.}}/V_{\text{кол.}}$ 1:5) супроводжувалося зростанням рівня активності досліджуваного ферменту. Зокрема, у всіх точках вимірювання (24, 48 і 72 год) каталазна активність була вищою, ніж за співвідношення $V_{\text{сер.}}/V_{\text{кол.}}$ 2:5

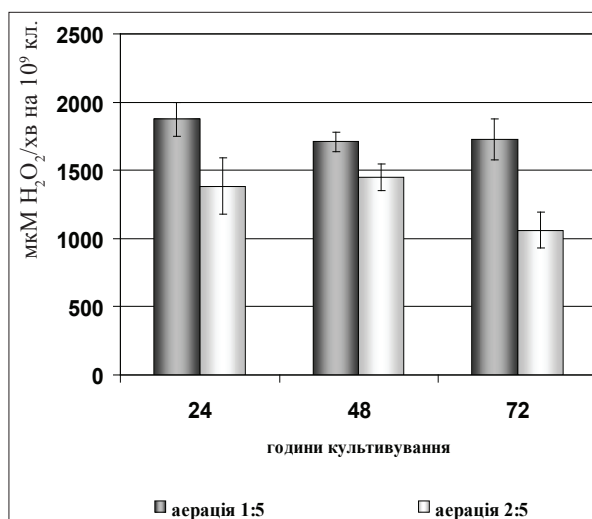


Рис. 3. Зміни каталазної активності штаму *Corynebacterium ammoniagenes* УКМ Ас-732 за постійного перемішування та різного ступеня аерації

та становила 1875, 1735 та 1727 мкМ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{хв}$ на 10^9 кл., відповідно. Отже, на даному етапі дослідження було з'ясовано, що підвищення ступеня аерації призводить до активізації систем захисту від оксидативного стресу незалежно від віку культури, хоча в обох випадках зберігалась тенденція до зниження активності ферменту у міру старіння культури.

З огляду на те, що ступінь насиченості середовища культивування киснем призводив до активізації каталазної активності штаму *C. ammoniagenes*, ми вважали за доцільне дослідити, яким чином впливатимуть на активність ферменту умови глибинного культивування (тобто наблизені до анаеробних).

На першому етапі було досліджено динаміку росту штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732 за умов глибинного культивування і показано, що, на відміну від вирощування за умов постійного перемішування, під час глибинного культивування не спостерігається яскраво вираженої зміни фаз розвитку культури (рис. 4).

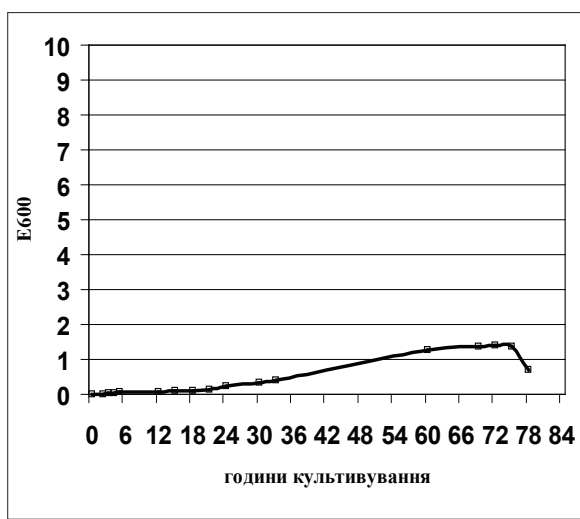


Рис. 4. Динаміка росту *Corynebacterium ammoniagenes* УКМ Ас-732 у середовищі для коринебактерій 53 за умов глибинного культивування

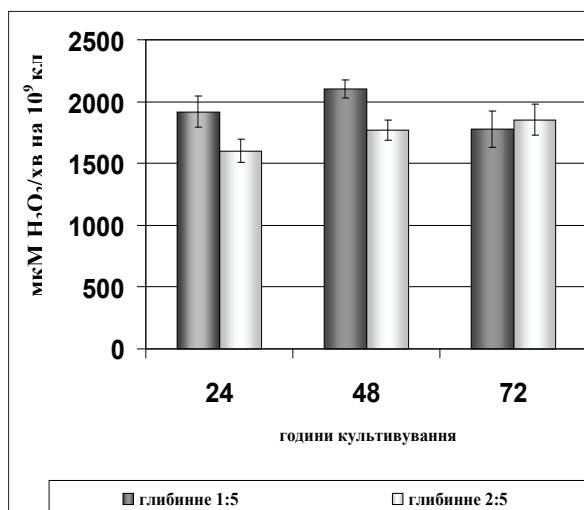


Рис. 5. Зміни каталазної активності штаму *Corynebacterium ammoniagenes* УКМ Ас-732 за глибинного культивування та різного ступеня аерації

Зважаючи на отримані результати, надалі рівень каталазної активності ми вимірювали у тих самих часових проміжках, що й для культури, яка росла за постійного перемішування. Було показано (рис. 5), що за співвідношення $V_{\text{сер.}}/V_{\text{кол.}}$ 2:5 ферментативна активність культури поступово зростає й сягала найвищого рівня на 72-гу годину росту – 1826 мкМ H₂O₂/хв на 10⁹ кл.

За співвідношення $V_{\text{сер.}}/V_{\text{кол.}}$ 1:5 та умов глибинного культивування реєстрували найвищий рівень активності ферменту серед усіх досліджених варіантів під час росту культури у рідких живильних середовищах (24-та година – 1917,

48-ма година – 2064 і 72-га година культивування – 1793 мкМ H₂O₂/хв на 10⁹ кл). Отже, за умов глибинного культивування в обох досліджених випадках каталазна активність була відчутно вищою, порівняно з умовами культивування за постійного перемішування, й сягала рівня активності ферменту за поверхневого росту культури на агаризованих середовищах.

Висновки

Таким чином, у результаті проведених досліджень нами було встановлено, що каталазна активність штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732 залежить від складу та консистенції живильного середовища. Зокрема, вища каталазна активність була виявлена у коринебактерій, вирощених на щільних живильних середовищах. Культивування дослідженого штаму на загальноживаному м'ясопептонному середовищі та середовищі 53 дозволило встановити вплив хімічного складу живильних середовищ на каталазну активність коринебактерій. Було з'ясовано, що стадія розвитку культури відчутно впливає на рівень каталазної активності дослідженого штаму. Так, найвищу активність ферменту виявляли у культури у ранній логарифмічній фазі росту, що узгоджується з даними літератури, щодо інших мікроорганізмів. Також було показано, що каталазна активність штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732 залежала від ступеня насиченості середовища киснем – як надлишок, так і нестача кисню супроводжувалися підвищенням активності ферменту.

- Смирнова Г. В. Роль антиоксидантних систем в отклике бактерий *Escherichia coli* на действие ацетамидофенола и антибиотиков / Г. В. Смирнова, О. А. Торхова, О. Н. Октябрьский // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 2. – С. 149–156.
- Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH. Catalogue of strains / Forth Ed. – 1989. – 459 p.
- Семчишин Г. М. Вплив руйнування клітин *Escherichia coli* на каталітичні властивості каталази / Г. М. Семчишин, М. В. Дильовий, А. О. Клименко, В. І. Лушак // Укр. біохім. журн. – 2001. – Т. 72, № 1. – С. 24–28.

- Брюханов А. Л. Каталаза и супероксиддисмутазы: распространение, свойства и физиологическая роль в клетках строгих анаэробов / А. Л. Брюханов, А. И. Нетрусов // Биохимия. – 2004. – Т. 69. – Вып. 9. – С. 1170–1186.
- Kim H. Characterization of the major catalase from *Streptomyces coelicolor* ATCC 10147 / H. Kim, J. Lee, Y. C. Hah, J-H. Roe // Microbiology. – 1994. – № 140. – P. 3391–3397.
- Loewen P. C. Purification and characterization of catalase-1 from *Bacillus subtilis* / P. C. Loewen, J. Switala // Biochemistry of cell biology. – 1987. – Vol. 65. – P. 939–947.

I. Furtat, N. Kunitsya

INFLUENCE OF CULTIVATION ON CATALASE ACTIVITY OF *CORYNEBACTERIUM AMMONIAGENES* UCM AS-732 STRAIN

The influence of medium composition and cultivation conditions on the activity of Corynebacterium ammoniagenes catalase UCM As-732 in culture growth dynamics was investigated. This strain showed the greatest catalase activity in the early log phase. It was determined, that catalase activity of culture, grown in liquid culture medium, was higher than in case of the cultivation conditions on agar medium. Also it was found, that the oxygen excess as well as deficiency thereof causes increasing activity of this enzyme for non-pathogenic corynebacteria.

Keywords: non-pathogenic corynebacteria, catalase activity, cultivation conditions, growth dynamics.