

## Utilizácia selénu baktériami a jeho distribúcia v bunkových štruktúrach

MARIÁN MAČOR - MIROSLAVA KRETOVÁ - MÁRIA KOREŇOVSKÁ -  
PETER SIEKEL - JOZEF GRONES

**SÚHRN.** Študovala sa schopnosť grampozitívnych a gramnegatívnych baktérií rásť v prítomnosti vyšších koncentrácií seleničitanu. Práca sa sústredila predovšetkým na baktérie rodu *Acetobacter*. Z piatich sledovaných kmeňov iba *A. pasteurianus* 3614 rastie až do koncentrácie 56,8 g.l<sup>-1</sup>. Z desiatich analyzovaných prirodzených izolátov *Bacillus cereus* najlepšie rastúci kmeň utilizoval seleničitan do koncentrácie 3,5 g.l<sup>-1</sup>. Ďalej sa sledovala kumulácia selénu v rôznych baktériách a jeho distribúcia v bunkových štruktúrach. Testovalo sa 17 kmeňov viacerých druhov baktérií, z ktorých druh *Acetobacter* inkorporoval až 39 % selénu v bunkových štruktúrach, naproti tomu *Bacillus cereus* 5 %, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium brevis*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Trigonopsis variabilis* od 1 do 5 %, kým *Serratia marcescens* menej ako 1 %.

**KĽÚČOVÉ SLOVÁ:** *Acetobacter*; *Bacillus*; seleničitan; akumulácia selénu

Selén ako mikroelementárny kov je prítomný v prírodnom prostredí v pevnej forme, ale aj rozpustený ako súčasť mnohých minerálnych vôd. Selén je prítomný vo fosílnych palivách, v schránkach organizmov, v alkalických zeminách a je súčasťou aj viac ako 40 minerálov [1, 2]. V bunkách živých systémov je selénu okolo 0,0001 % [3] a prednostne je zabudovávaný v mikromolárnych koncentráciách do bunkových štruktúr.

Selén patrí medzi esenciálne prvky, vo vyššej koncentrácii je toxický. Niektoré baktérie a plesne sú rezistentné na vysoké koncentrácie seleničita-

---

RNDr. Marián MAČOR, CSc., Mgr. Miroslava KRETOVÁ, Doc. RNDr. Jozef GRONES, CSc., Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava 4.

RNDr. Mária KOREŇOVSKÁ, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava 26.

RNDr. Peter SIEKEL, CSc., Ústav molekulárnej biológie SAV, Dúbravská cesta 21, 824 51 Bratislava 4; Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava 26.

Korešpondujúci autor: Doc. RNDr. Jozef GRONES, CSc., e-mail: grones@fns.uniba.sk

nov ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) a selenanov ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ), pričom tieto formy redukujú na elementárny selén, čím sa zamedzí ich toxicita [4].

Selén sa v bunkách inkorporuje do cysteínu, pričom vytvára selenocysteín, ktorý je súčasťou aktívnych centier mnohých enzýmov. Časť selénu sa inkorporuje aj do iných aminokyselín, ako selenometionín a metylselenocysteín, ktoré sú súčasťou biologických systémov [5, 6].

Množstvo selénu v prírode je rôzne v závislosti od geografickej polohy študovanej lokality. V niektorých krajinách sú koncentrácie solí selénu v pôde do 130 mg na kilogram zeminy, ale na Slovensku je to iba 25 mg. Obsah selénu v prírode sa premieta aj do jeho obsahu v potravinách, ako sú napr. mlieko, syry, vajcia, chlieb a ďalšie. Potrebnú koncentráciu selénu pre náš organizmus získame z potravín, ktoré selén výraznejšie kumulujú. Vysoký obsah selénu sa vyskytuje aj v rybách, fazuli, hubách alebo v orechoch. Iným dodatočným zdrojom sú bakteriálne proteíny, ktoré selén získali kultiváciou baktérií na kultivačných médiach obohatených seleničitanom a sú súčasťou štartovacích kultúr v miečnych výrobkoch (napr. jogurty).

Prítomnosť selénu v bunkách má nesmierny význam, pretože funguje ako antioxidant a chráni organizmy pred oxidačným stresom, ktorý spôsobuje zmeny v metabolizme buniek. Antioxidačné vlastnosti majú aj iné mikronutrienty, ako sú vitamíny skupiny C a E, flavonoidy, antokyány a tiež minerálne prvky ako napr. zinok, chróm a iné.

Cieľom predloženej práce bolo overiť schopnosť rastu baktérií na vyšších koncentráciách seleničitanových solí a analyzovať distribúciu selénu v bunkových štruktúrach sledovaných baktérií.

## Materiál a metódy

### *Bakteriálne bunky a kultivačné médiá*

Baktérie používané v tejto práci sú opísané v tab. 1. Všetky baktérie rástli na LB médiu pri teplote 37 °C [7]. Bunky *Acetobacter* sa kultivovali na YPG kultivačnom médiu (kvasničný autolýzát 5 g, peptón 3 g, D-glukóza 20 g.l<sup>-1</sup>) pri teplote 28 °C [8] na rotačnej trepačke pri 150–170 ot.min<sup>-1</sup> do stacionárnej fázy rastu. Do kultivačných médií sa pridával seleničitan v koncentračnom rozsahu od 0 do 40 g.l<sup>-1</sup>.

### *Frakcionácia bakteriálnych buniek*

Bakteriálne bunky narastené v 100 ml LB alebo YPG kultivačného média sa nakoncentrovali centrifugáciou 10 min pri 10 000 g (supernatant - frak-

TAB. 1. Distribúcia selénu v bunkových štruktúrach sledovaných baktérií.  
 TAB. 1. Distribution of selenium in the cell structure of studied bacterial genera.

Baktérie <sup>1</sup> (DMB)	Koncentrácia selénu <sup>2</sup> [mg.l <sup>-1</sup> ]			
	kultivačné médium <sup>3</sup>	bunkové steny <sup>4</sup>	zrazenina po sírane amónnom <sup>5</sup>	supernatant <sup>6</sup>
<i>Acetobacter pasteurianus</i> 3614	226	895	302	310
<i>Aerobacter areogenes</i>	512	1094	55	65
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	630	520	300	330
<i>Bacillus cereus</i> 2	640	492	314	312
<i>Bacillus cereus</i> 5	1550	168	0	5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	684	463	271	270
<i>Escherichia coli</i> HB101	571	650	210	239
<i>Escherichia coli</i> DH1	560	672	200	245
<i>Flavobacterium brevis</i>	494	666	246	294
<i>Klebsiella oxytoca</i>	510	505	381	320
<i>Serratia marcescens</i>	630	980	23	77
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	590	465	329	302
<i>Streptococcus faecalis</i>	604	468	450	232
<i>Trigonopsis variabilis</i>	498	643	290	253

DMB - Zbierka mikroorganizmov na Katedre molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta UK v Bratislave.

DMB - Collection at the Department of Molecular Biology Comenius University in Bratislava. 1 - bacteria, 2 - concentration of the selenite, 3 - cultivation medium, 4 - cell walls, 5 - pelet after ammonium sulphate precipitation, 6 - supernatant.

cia 1). Bunky sa suspendovali, dvakrát premyli v tlmivom roztoku A (10 mmol.l<sup>-1</sup> TRIS.HCl s pH 8,0; 10 mmol.l<sup>-1</sup> EDTA) a následne usadili centrifugáciou 10 min pri 10 000 g. Usadené bunky sa suspendovali v 10 ml tlmivého roztoku A a následne homogenizovali ultrazvukom do úplného rozbitia buniek. Homogenát sa centrifugoval pri 10 000 g 10 min (sediment - frakcia 2), pričom proteíny v supernatante sa prezrážali síranom amónnym do 75% saturácie. Po centrifugácii 10 min pri 12 000 g sa supernatant zliat (frakcia 3) a sediment sa rozpustil v 10 ml tlmivého roztoku A (frakcia 4). Vo všetkých frakciách sa stanovila koncentrácia selénu v mg.l<sup>-1</sup>.

#### Stanovenie koncentrácie selénu

Koncentrácia selénu v jednotlivých vzorkách sa stanovovala plameňovou spektrofotometriou (Spektrometer Perkin Elmer 4100, USA). Použila sa

selénová elektróda Perkin Elmer. Analytické spektrálne čiary sú na úrovni 196,0 nm, pri šírke štrbiny 2,0 H v plameňoch acetylénu. Všetky roztoky boli analytickej čistoty (Merck, Darmstadt, Germany). Pracovný štandardný roztok sa pripravil rozpustením 1000 mg.l<sup>-1</sup> štandardného seleničitanu (Merck) vždy tesne pred použitím.

## Výsledky a diskusia

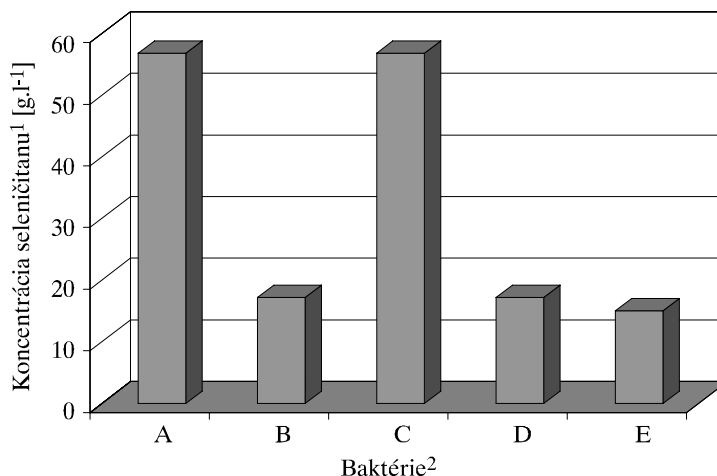
Na obohatenie potravín mikronutrientami, ako je selén, sa v poslednom období využívajú bakteriálne bunky, ktoré sú schopné utilizovať anorganický seleničtan, alebo selenan a inkorporovať ho do proteínových štruktúr v podobe selenocysteínu [5, 6]. Nie všetky bakteriálne bunky sú schopné rásť na vyšších koncentráciách selénu a preto aj množstvo selénu v proteínoch je pomerne nízke. Predchádzajúce testy dokázali, že pre tento účel sa dajú výhodne využívať potravinárske baktérie *Lactobacillus* a *Lactococcus*, ktoré sú schopné rásť na pomerne vysokých koncentráciách solí selénu (40 g.l<sup>-1</sup> a 10 g.l<sup>-1</sup>) [9]. Naším cieľom bolo skúmať schopnosti rastu rôznych druhov baktérií na seleničtanoch a charakterizovať stupeň inkorporácie selénu do bunkových štruktúr. Zamerali sme sa predovšetkým na gramnegatívne baktérie rodu *Acetobacter* a grampozitívne baktérie *Bacillus cereus*.

### *Rast baktérií rodu Acetobacter na soliach selénu*

Do skupiny významných baktérií využívaných v potravinárskom a farmaceutickom priemysle patria aj baktérie rodu *Acetobacter*. Sledovala sa ich schopnosť rásť na YPG kultivačnom médiu suplementovanom s rôznymi koncentraciami seleničtanu. Pomaly rastúce bunky *A. pasteurianus* 3613 a *A. pasteurianus* 2374 sú schopné rásť na soliach selénu do koncentrácie 17,2 g.l<sup>-1</sup>, pričom *A. aceti* 3620 len do koncentrácie 16,1 g.l<sup>-1</sup>. Naproti tomu rýchlo rastúce baktérie *A. pasteurianus* 3612 a *A. pasteurianus* 3614 po čias-točnej adaptácii na seleničtan tolerujú až koncentráciu 56,8 g.l<sup>-1</sup> (obr. 1).

### *Rast baktérií Bacillus cereus na seleničtane*

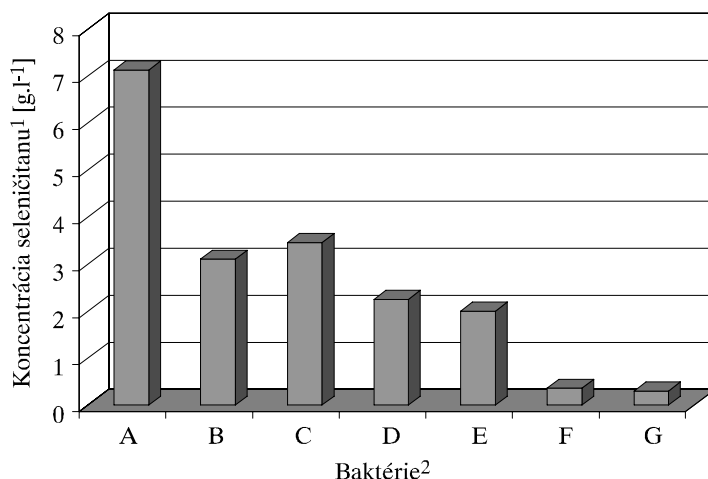
Sledovala sa schopnosť rastu desiatich prírodných izolátov - kmeňov *B. cereus* na rôznych koncentráciách seleničtanu. Baktérie využívajú soli selénu v koncentračnom rozsahu od 0,3 g.l<sup>-1</sup> až po 3,46 g.l<sup>-1</sup>. Z testovaných baktérií najlepšie rastie kmeň *B. cereus* 2 a najhoršie *B. cereus* 5 (obr. 2). Porovnanie schopnosti rastu a využívania solí selénu baktériami ukazuje, že bunky rodu *Acetobacter* rastú podstatne lepšie ako bunky *B. cereus*, ktoré sú



OBR. 1. Maximálna koncentrácia seleničitanu, pri ktorej sú bunky rôznych kmeňov rodu *Acetobacter* schopné rásť na YPG médiu.

FIG. 1. Maximal concentraion of the selenite that are able to grow different strains *Acetobacter* genera on YPG medium.

1 - concentration of selenite, 2 - bacteria. A - *Acetobacter pasteurianus* 3612, B - *Acetobacter pasteurianus* 3613, C - *Acetobacter pasteurianus* 3614, D - *Acetobacter pasteurianus* 2374, E - *Acetobacter aceti* 3620.



Obr. 2. Maximálna koncentrácia seleničitanu, pri ktorej sú bunky baktérií *Escherichia coli* a *Bacillus cereus* schopné rásť na LB médiu.

FIG. 2. Maximal concentraion of the selenite that are able to grow bacteria *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* on LB medium.

1 - concentration of selenite, 2 - bacteria. A - *Escherichia coli* DH1, B - *Bacillus cereus* 1, C - *Bacillus cereus* 2, D - *Bacillus cereus* 3, E - *Bacillus cereus* 4, F - *Bacillus cereus* 5, G - *Bacillus cereus* 6.

schopné prežívať iba na polovičnej koncentrácii seleničitanu ako napríklad bunky *E. coli*, pre ktoré je limitná koncentrácia až 7,13 g.l<sup>-1</sup> [10].

#### *Distribúcia selénu v bunkových štruktúrach baktérií*

Niektoré baktérie sú schopné transportovať selén do bunky, kde ho ukládajú po redukcii seleničitanov na selén v cytoplazme v kryštalickej alebo amorfnej forme, pričom časť sa inkorporuje do cysteínu ako selenocysteín a tiež do iných selenoproteínov. Medzi ťažké kovy, ktoré sa v bunkách *E. coli* usadzujú v redukovanej kryštalickej podobe patrí aj telúr [11, 12]. Amorfná štruktúra bola pozorovaná v bunkách *Acetobacter pasteurianus* po ich kultivácii na soliach selénu [9].

Sledovala sa skupina 17 rôznych bakteriálnych rodov *Acetobacter pasteurianus*, *Aerobacter areogenes*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium brevis*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Shigella dysenteriae*, *Trigonopsis variabilis*, ktoré sa kultivovali na tekutom LB médiu s prídavkom 1,7 g.l<sup>-1</sup> seleničitanu. Po 24 h kultivácie pri 37 °C sa bunky frakcionovali, ako je opísané v časti Materiál a metódy. V jednotlivých frakciách sa stanovovala koncentrácia selénu spektrofotometricky (pozri Materiál a metódy). Z testovaných baktérií *Bacillus cereus* kmeň 8, *Pseudomonas aeruginosa* a *Shigella dysenteriae* neboli schopné rásť na tejto koncentrácii seleničitanu.

Výsledky uvedené v tab. 1 ukazujú, že najnižšia koncentrácia selénu v kultivačnom médiu zostala po kultivácii buniek *A. pasteurianus* 3614. V membránovej frakcii najviac selénu uchovávali kmene *Aerobacter areogenes* a *Serratia marcescens* (35–39 %) a najmenej, necelých 10 %, *B. cereus* kmeň 5. Naproti tomu druh *S. marcescens* inkorporuje do bunkových štruktúr len necelé 1 % selénu.

V predchádzajúcej práci pri charakterizácii buniek *Lactobacillus* a *Lactococcus* [9], ktoré sa využívajú ako štartovacie kultúry pri výrobe mliečnych výrobkov, sú kontaminujúcim mikroorganizmom bunky *B. cereus*. Ako ukázali výsledky tejto práce, rast buniek *B. cereus* je pri vyššej koncentrácii seleničitanu v prostredí výrazne inhibovaný. Keďže sú bunky *B. cereus* prirodzeným patogénom v mlieku, v prostredí selénu sa netreba obávať ich patogénnych účinkov.

Táto práca bola realizovaná z finančných prostriedkov grantu VEGA - 1/7230/20.

## Literatúra

1. OREMLAND, R. S. - STEINBERG, N. A. - PRESSER, T. S. - MILLER, L. G.: In situ bacterial selenate reduction in the agricultural drainage systems of western Nevada. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1991, s. 615-617.
2. OREMLAND, R. S. - MILLER, L. G. - CULBERTSON, C. W. - CONNELL, T. L. - JAHNKE, L.: Degradation of methyl bromide by methanotrophic bacteria in cell suspensions and soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1994, s. 3640-3646.
3. STOLZ, J. F. - OREMLAND, R. S.: Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiology Review*, 23, 1999, s. 615-627.
4. VAN FLEET-STALDER, V. - GRLEYK, H. - BACHOFEN, R. - CHASTEEN, T. G.: Effect of growth condition on production of methyl selenides in cultures of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19, 1997, s. 98-103.
5. STADTMAN, T. C.: Selenocysteine. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 1996, s. 83-100.
6. MAČOR, M. - GRONES, J.: Genetická podstata inkorporácie selénu do proteínov v bunkách baktérií. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 40, 2001, s. 101-118.
7. SAMBROOK, J. - FRITSCH, E. F. - MANIATIS, T.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2. vyd. Cold Spring Harbor (NY) : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
8. GRONES, J. - ŠKERENOVÁ, M. - BEDERKOVÁ, K. - TURŇA, J.: Isolation and characterisation of plasmid pAC1 from *Acetobacter pasteurianus*. *Biologia (Bratislava)*, 44, 1989, s. 1181-1186.
9. GRONES, J. - MAČOR, M.: Schopnosť baktérií viazať a premieňať selén na biologicky využiteľnú formu. *Chemické listy*, 94, 2000, s. 129-131.
10. GRONES, J. - MAČOR, M. - SIEKEL, P. - BILSKÁ, V.: Schopnosť *Escherichia coli* a *Lactobacillus* spp. akumulovať selén v biologicky využiteľnej forme. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 38, 1999, s. 45-53.
11. BURIAN, J. - BEŇO, J. - MAČOR, M. - VAŇOVÁ, N.: Analýza fenotypovej rezistencie klinických kmeňov *Escherichia coli*. *Československá epidemiológia, mikrobiológia a imunológia*, 38, 1989, s. 167-173.
12. BURIAN, J. - TU, N. - KLÚČAR, L. - GULLER, L. - LLOYD-JONES, G. - STUHLÍK, S. - FEJDI, P. - SIEKEL, P. - TURŇA, J.: In vivo and in vitro cloning and phenotype characterization of tellurite resistance determinant conferred by plasmid pTE53 of a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica*, 43, 1998, s. 589-599.

Do redakcie došlo 18.9.2003.

### Utilisation of selenium by bacteria and its distribution in cell structures

MAČOR, M. - KRETOVÁ, M. - KOREŇOVSKÁ, M. - SIEKEL, P. - GRONES, J.:  
Bull. potrav. Výsk., 42, 2003, p. 205-212.

SUMMARY. In this study, the ability of selected Gram-negative and Gram-positive bacteria to grow in the presence of higher concentrations of selenite was evaluated. Five strains of *Acetobacter* sp. were tested in particular. Out of them only strain *A. pasteurianus* 3614 was able to grow at selenite concentration up to 56.8 g.l<sup>-1</sup>. Out of ten analysed *Bacillus cereus* isolates, the best growing strain utilized selenium at concentrations up to 3.5 g.l<sup>-1</sup>. Accumulation of selenium in various bacteria and its distribution in cell structures were also studied. Among the 17 bacterial species studied, *Acetobacter* sp. incorporated up to 39 % of selenium in cell structures. On the other hand, *Bacillus cereus* incorporated 5 %, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium brevis*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Trigonopsis variabilis* from 1 to 5 %, and *Serratia marcescens* less than 1 %.

KEYWORDS: *Acetobacter*; *Bacillus*; selenite; selenite accumulation