

УДК 579.841.31.086.164

ТЕСТИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ПО НАКОПЛЕНИЮ ПОЛИ- β -ОКСИБУТИРАТА ПРИ ВИТАЛЬНОМ ОКРАШИВАНИИ ИХ КОЛОНИЙ ФОСФИНОМ 3R

Бонарцева Г. А.

Предлагается простой флуоресцентный метод окрашивания поли- β -оксибутирата в клетках бактерий при выращивании их колоний на твердой среде в чашках Петри в присутствии витального липофильного красителя фосфина 3R. О наличии полимера свидетельствует флуоресценция колоний в ультрафиолетовом свете.

Метод может быть применен для первичного качественного отбора активных штаммов клубеньковых бактерий люцерны и фасоли. Колонии активных штаммов, содержащие поли- β -оксибутират в небольших количествах, не обладают флуоресценцией; колонии малоактивных штаммов, содержащие большое количество гранул полимера, дают ярко-зеленую флуоресценцию при просмотре в УФ-свете. Простота выполнения метода делает его пригодным для серийных анализов.

Поли- β -оксибутират (полиэфир β -оксимасляной кислоты) является запасным веществом энергии и углерода, характерным только для прокариот.

Поли- β -оксимасляная кислота (ПОМК) представляет собой не только запас углерода и энергии, но также и электронный сток, в котором избыток восстановителей может быть накоплен в осмотически и химически нейтральном соединении. У некоторых микроорганизмов ПОМК может накапливаться в больших количествах, составляя до 50—80% от веса сухих клеток [5, 7]. В течение некоторого времени наличие ПОМК использовали как таксономический критерий для классификации бактерий. Гавард применил его для классификации аэробных грамотрицательных бактерий [13], Стейнер — для классификации видов внутри рода псевдомонад [19]. Однако к настоящему времени накопилось достаточно данных, указывающих, что этот признак не является стабильным: количество синтезируемого ПОМК высоко вариабельно и зависит от условий культивирования [4, 7]. ПОМК удалось обнаружить в очень многих физиологических и морфологических группах прокариот [7]. Структурно ПОМК присутствует в клетках микроорганизмов либо в виде дискретных включений, либо в виде гранул [12]. Мембраны гранул, по-видимому, обладают более простым строением, чем обычные трехслойные мембраны бактерий [20]. Ферментные системы синтеза и распада ПОМК локализованы в мембранной оболочке гранул [14]. По мнению Романова [7], «...вследствие ряда своих специфических свойств (осмотической и химической нейтральности, высокой восстановленности и абсолютной нерастворимости в воде) это соединение является идеальным запасным веществом».

Изучение метаболизма ПОМК у разных видов микроорганизмов вследствие тесной зависимости синтеза полимера от условий выращивания интересно как в биохимическом, так и в экологическом плане, так как помогает понять, как происходит приспособление бактерий к условиям существования.

Для оценки содержания ПОМК в клетках бактерий используют разные методы: химические (с разрушением клеток и экстракцией ПОМК хлороформом [18, 20]), физико-химические (ИК-спектрометрия) [4], а также качественные цитохимические методы [6]. Химические методы определения сложны, длительны, трудоемки и недостаточно точны. Определение ПОМК с помощью ИК-спектрометрии требует сложной аппаратуры и особого приготовления образцов для анализа. Цитохимические методы определения ПОМК просты в исполнении, быстро выполнимы, не требуют сложной аппаратуры, но используются только для качественной оценки содержания ПОМК в клетке [10, 15].

Наиболее широко распространенным методом качественного выявления ПОМК в клетке является метод окраски липофильными красителями — суданом черным Б или суданом III. Кроме того, для этой цели могут быть использованы люминесцентные красители (нильский синий, фосфин 3R, 3,4-бензпирен и др.). При всех методах рекомендуется тепловая фиксация препарата с последующей окраской красителем и отмывом от него [6]. Однако некоторые флуоресцентные красители ввиду способности растворяться в воде могут окрашивать липиды прижизненно. К ним относятся, например, nilьский синий, бензпирен, родамин Б, фосфин 3R. Из перечисленных красителей наибольший интерес представляет фосфин 3R, так как известна его способность к избирательному окрашиванию нейтральных липидов и ПОМК. 3,4-Бензпирен растворим во всех липидах, nilьский синий наряду с нейтральными липидами и ПОМК окрашивает ненасыщенные жирные кислоты [6], так что этими красителями вряд ли с успехом можно воспользоваться для избирательной дифференциации ПОМК.

В данной работе описан метод избирательного окрашивания поли- β -оксибутирата фосфином 3R при выращивании колоний микроорганизмов на твердой среде.

Объекты и методы исследования

Как объект для прижизненного окрашивания поли- β -оксибутирата использовали клубеньковые бактерии. Известно, что многие азотфиксирующие микроорганизмы синтезируют ПОМК [7]. Клубеньковые бактерии в качестве запасных веществ накапливают ПОМК, гликоген, полифосфаты, волютин. Синтез запасных биополимеров в большой степени зависит от условий выращивания [10, 11, 16, 20]. Накоплению ПОМК у клубеньковых бактерий, по мнению ряда авторов, способствует избыток углеродных и дефицит азотных субстратов, а также лимитирование по кислороду [3, 7, 20]. При культивировании бактерий в строго определенных условиях количество синтезированного ПОМК может быть стабилизировано и может использоваться как четкая характеристика отдельных штаммов *Rhizobium* [3, 4]. В литературе имеются данные о связи содержания ПОМК в клетках клубеньковых бактерий со степенью их активности. Романовым с соавт. установлено, что в бактероидах, выделенных из клубеньков люпина и кормовых бобов, инокулированных эффективным штаммом *Rhizobium*, содержание ПОМК было много ниже, чем в бактероидах неэффективного штамма [8, 9]. Эта же обратная корреляция при определенных условиях выращивания была показана и в чистых культурах некоторых видов клубеньковых бактерий при определении ПОМК методом ИК-спектрометрии [3, 4]. Приведенные факты явились предпосылкой для использования метода витального окрашивания ПОМК при предварительном отборе активных штаммов клубеньковых бактерий, так как для практических целей важно обладать быстрым методом оценки азотфиксирующей способности *Rhizobium*. Уже испытано большое число разнообразных физиолого-биохимических свойств ризобий в качестве косвенных показателей эффективности, однако достоверных легко воспроизводимых критериев для отбора активных штаммов пока не найдено [1].

В работе использовали активные и малоактивные штаммы *R. meliloti* и *R. phaseoli*. Штаммы получены из Института сельскохозяйственной микробиологии (ВАСХНИЛ) и из Латвийской сельскохозяйственной академии. Штаммы *R. meliloti* 117, 42, 425а, 441, 5, 35, 415, 19, 5 — активные; Аз — малоактивный; 434а — неактивный. Штаммы *R. phaseoli* 673 — активный, 680 — малоактивный. Эффективность симбиоза была подтверждена в вегетационных опытах.

Микроорганизмы выращивали на агаризованной среде состава (в г): гороховый отвар, полученный при 20-минутном кипячении 50 г гороха, сахара — 5, K_2HPO_4 — 0,5, агар — 15, фосфин — 40 мг, 1 л водопроводной воды (рН 6,8—7,0). Предварительно навеску красителя растворяли в стерильной пробирке в небольшом объеме (1 мл) этилового спирта, затем добавляли немного (1—2 мл) стерильной воды и вносили в колбу с разогретой гороховой средой перед ее разливом в чашки Петри. Посев микроорганизмов для получения отдельных колоний проводили обычным способом. Исходя из того что пик накопления ПОМК у большинства бактерий приходится на стационарную фазу [2], бактерии выращивали при 30° в термостате 7 сут.

Метод выявления ПОМК при окрашивании микроорганизмов фосфином 3R основан на появлении вторичной флуоресценции при освещении колоний микроорганизмов ультрафиолетовым светом. Для этой цели использовали хроматоскоп; флуоресценция объектов при этом возбуждается в области 350—420 нм. Просмотр колоний клубеньковых бактерий в хроматоскопе проводили сразу же после извлечения чашек Петри из термостата и после хранения их в холодильнике при 4°.

Метод прижизненного окрашивания колоний фосфином 3R с целью выявления ПОМК был применен нами впервые. Длительное (в процессе роста) витальное окрашивание ПОМК фосфином 3R в бактериях имеет целый ряд преимуществ перед обычным окрашиванием с фиксацией препарата (например, по Попперу [6]). 1. Нет тепловой фиксации, значит, нет неизбежных при этом нарушений структурных элементов клетки; достигается именно специфическое окрашивание нативных гранул ПОМК, так как при отсутствии повреждений в клетке нет неспецифических взаимодействий красителя с окрашиваемым материалом. 2. При длительном в процессе роста воздействии красителя достигается наиболее полное проникновение его в окрашиваемый материал. Исключается нежелательная зависимость окрашивания материала от времени воздействия красителя (разные микроорганизмы требуют разного времени воздействия красителя при окрашивании обычным способом). 3. При мягком воздействии красителя (в малых концентрациях) в процессе роста, очевидно, нет нарушений в обмене веществ у микроорганизмов, поэтому краситель может, вероятно, накапливаться избирательно именно в гранулах ПОМК. 4. Отсутствует необходимость отмыва препарата от красителя. 5. После флуориметрических наблюдений объекты (колонии живых микроорганизмов) могут быть использованы для дальнейших пересевов.

Результаты и обсуждение

Предварительно совместно с сотрудниками Института микробиологии им. А. Кирхенштейна ЛатвССР Е. Д. Загребя и М. К. Гиновска была проведена работа по определению накопления ПОМК на разных средах в разных по активности штаммах клубеньковых бактерий методом ИК-

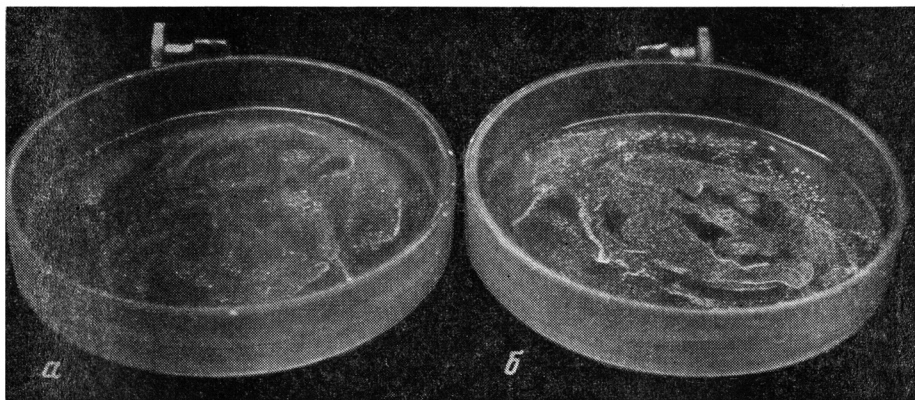
спектрометрии (при этом были использованы те же штаммы, что и в настоящей работе). Оптимальной средой для максимальной дифференциации по накоплению ПОМК между активными и малоактивными штаммами *R. meliloti* и *R. phaseoli* признана гороховая среда. При выращивании на данной среде ПОМК накапливается в клетках малоактивных штаммов в гораздо большем количестве чем в клетках активных.

В настоящей работе после 5—7 дней роста бактерий на твердой гороховой среде с добавлением фосфина 3R в разведении 1 : 25 000 колонии клубеньковых бактерий были просмотрены в хроматоскопе (разведение красителя выше чем 1 : 25 000 недостаточно для окраски ПОМК; рекомендуем использовать разведение от 1 : 10 000 до 1 : 25 000).

При просмотре в УФ-свете колонии активных штаммов, содержащие полимер в малых количествах, не обладали флуоресценцией; колонии же малоактивных штаммов, содержащие большое количество поли-β-оксибутирата давали ярко-зеленую флуоресценцию (рисунок). Колонии штаммов средней активности светились значительно слабее. Контрольные варианты, выращенные в отсутствие красителя, при просмотре в хроматоскопе собственной флуоресценции не имели.

В руководствах [6] при описании методов окраски липидов фосфином 3R говорится о возникновении в УФ-лучах серебристо-белой флуоресценции тканей. Мы также наблюдали серебристо-белую флуоресценцию колоний малоактивных штаммов клубеньковых бактерий на ранних стадиях развития культуры (3—4 сут), однако к 5—7 сут роста флуоресценция приобретала ярко-зеленый цвет. Полагаем, что изменение в цвете флуоресценции (от серебристо-белой до ярко-зеленой) может быть связано с формированием внутриклеточных гранул ПОМК, т. е. с изменением структуры окрашиваемого материала.

Ярко-зеленую флуоресценцию ПОМК можно наблюдать сразу после 5—7-дневного роста колоний в термостате, а также после хранения (можно длительного, до 1 мес) культур в холодильнике при 4°. Нами отмечено, что хранение в холодильнике усиливает интенсивность флуоресценции. Это может быть связано с тем, что гранулы ПОМК являются внутриклеточными образованиями, структурная организация которых тесно связана с обменом этого полимера. Установлено, что даже слабые физико-химические воздействия (замораживание, оттаивание, длительное центрифугирование и, вероятно, длительное охлаждение) приводят к тому, что гранулы теряют свою нативность, т. е. после этого не разрушаются деполимеразой ПОМК [14]. При стоянии культур в холодильнике возможна стабилизация гранул ПОМК и как следствие усиление зеленой флуоресценции. При длительном воздействии фосфина 3R в небольших концентрациях при росте колоний на чашках Петри, по всей видимости, достигается избирательное окрашивание ПОМК, краситель



Колонии активного 425а (а) и малоактивного 434а (б) штаммов клубеньковых бактерий люцерны в УФ-свете, окрашенные фосфином 3R

постепенно проникает из среды в клетки и затем накапливается в гранулах полимера. При окрашивании фосфином 3R обычным способом [6] избирательное окрашивание ПОМК может не иметь места, во всяком случае Сигуте с соавт. [10] не удалось наблюдать разницы в свечении разных по активности штаммов *Rhizobium* при обработке клеток фосфином 3R в течение 1 ч обычным методом окраски препарата.

Кроме фосфина 3R для той же цели был испытан другой витальный краситель липидов — нильский синий. Остал и Хольт использовали его для избирательного окрашивания ПОМК обычным способом в клетках *Bacillus megaterium* и *Azotobacter chroococcum* [15]. Однако в наших опытах отличия между разными по активности и штаммами клубеньковых бактерий при выращивании колоний на чашках Петри в присутствии нильский синий не обладает способностью избирательного окрашивания штаммы окрашивались одинаково. Вероятно, это связано с тем, что нильский синий не обладает способностью избирательного окрашивания ПОМК, одновременно окрашиваются фосфолипиды и ненасыщенные жирные кислоты [6], а известно [10], что активные клубеньковые бактерии накапливают значительное количество этих кислот. Фосфин 3R имеет, по-видимому, большое сродство к ПОМК, чем нильский синий.

В заключение автор выражает благодарность В. И. Бирюзовой и М. Н. Поглазовой за ценные советы и помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бонарцева Г. А., Мышкина В. Л., Мишустин Е. Н. Изв. АН СССР. Сер. биол., 1983, № 4, с. 553.
2. Веденина Н. Я. Микробиология, 1968, т. 37, с. 5.
3. Загреба Е. Д., Селиверстова Т. И., Гиновска М. К., Клишцаре А. Я., Якобсон Ю. О. Изв. АН СССР. Сер. биол., 1982, № 6, с. 906.
4. Загреба Е. Д., Клишцаре А. Я., Эйбус Я. А., Якобсон Ю. О. Изв. АН ЛатвССР 1975, № 9, с. 78.
5. Мишустин Е. Н., Шильникова В. К. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. М.: Наука, 1973, с. 288.
6. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. М.: Изд-во иностр. лит., 1962.
7. Романов В. И. Успехи биохимии, 1977, т. 18, с. 211.
8. Романов В. И., Юшкова Л. А., Кретович В. Л. Докл. АН СССР, 1974, т. 216, с. 694.
9. Романов В. И., Юшкова Л. А., Кретович В. Л. Микробиология, 1975, т. 44, с. 820.
10. Сигута В. А. Идентификация клубеньковых бактерий разной степени эффективности (цитохимические исследования): Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. М.: ТСХА, 1979, с. 9.
11. Шильникова В. К., Сигута В. А. Изв. ТСХА, 1982, вып. 3, с. 192.
12. Dunlop W. F., Pobards A. W. J. Bacteriol., 1973, v. 114, p. 1271.
13. Haward A. C. J. Gen. Microbiol., 1959, v. 21, p. 11.
14. Merrick I. M. J. Bacteriol., 1965, v. 90, p. 965.
15. Ostle A. G., Holt I. G. Appl. Environm. Microbiol., 1982, v. 44, № 1, p. 238.
16. Pankhurst C. E., Craig A. S. J. Gen. Microbiol., 1978, v. 106, p. 207.
17. Pfester R. M., Lundren D. G. J. Bacteriol., 1964, v. 88, p. 1119.
18. Poindexter J. S., Eley L. F. J. Microbiol. Meth., 1983, v. 1, p. 1.
19. Stanier R. I., Palleroni N. I., Doudoroff M. J. Gen. Microbiol., 1966, v. 43, p. 159.
20. Zevenhuizen L. P. T. M. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. and Serol., 1981, v. 47, p. 481.

Институт микробиологии
АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
15.XI.1983

AN ASSAY OF THE ACTIVITY OF NODULE BACTERIA IN TERMS OF POLY- β -BUTYRATE ACCUMULATION DURING STAINING OF THEIR COLONIES WITH PHOSPHINE 3R

Bonartseva G. A.

The paper describes a simple fluorescent technique of poly- β -hydroxybutyrate staining in bacterial cells when their colonies are grown on a solid medium in Petri dishes in the presence of phosphine 3R, a vital lipophilic dye. The fluorescence of colonies in UV light shows the presence of the polymer.

The technique can be used in particular for a primary qualitative selection of the active strains of lucerne and bean nodule bacteria. Colonies of the active strains containing poly- β -hydroxybutyrate in small quantities have no fluorescence. Colonies of the strains with a low activity and with a high content of the polymer produce bright-green fluorescence in UV light.

The technique is very simple and can be applied to serial analyses.