

УДК 579.841.31.013

© 1994 г. БОНАРЦЕВА Г. А., МЫШКИНА В. Л., ЗАГРЕБА Е. Д.

**СОДЕРЖАНИЕ ПОЛИ-β-ОКСИБУТИРАТА В КЛЕТКАХ РАЗНЫХ ВИДОВ *RHIZOBIUM* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДА И АЗОТА В СРЕДЕ**

Исследована способность к синтезу поли-β-оксималяной кислоты (поли-β-оксибутирата) у коллекционных штаммов (активных и малоактивных) *Rhizobium phaseoli*, *R. meliloti*, *R. trifolii* при выращивании их на разных источниках углерода и азота. Показано, что в зависимости от использованных источников углерода и азота синтез поли-β-оксибутирата можно избирательно индуцировать как у активных штаммов *Rhizobium*, так и у малоактивных. Среди изученных штаммов выявлен потенциальный продуцент поли-β-оксибутирата — малоактивный штамм *R. phaseoli* 680, клетки которого при выращивании на среде с сахарозой и нитратом содержали 65% поли-β-оксибутирата от веса сухих клеток.

Поли-β-оксибутират (ПОБ) — широко распространенное внутриклеточное запасное вещество, типичное для прокариот. Впервые ПОБ был выделен более 60 лет назад из клеток аэробных бацилл [13]. В настоящее время у некоторых микроорганизмов выделен ряд биополимеров сходного строения, имеющих в своей основе другие мономеры. Все они отнесены к классу поли-β-гидроксиалканоатов (ПОА) [12]. В зависимости от типа микроорганизма, а также от физиологических условий его выращивания ПОБ может выполнять функцию не только запаса углерода и энергии, но также и электронного стока, в котором избыток восстановителей может быть накоплен в осмотически и химически нейтральном соединении. Некоторые микроорганизмы способны накапливать ПОБ до 80—90% от веса сухих клеток [9].

Рассматривая синтез ПОБ клубеньковыми бактериями, необходимо отметить, что это свойство в полной мере присуще всем видам *Rhizobium*. По данным Винсента с соавт. [18], Томболини с соавт. [17], содержание полимера у *Rhizobium* колеблется в пределах 30—55% от веса сухих клеток. ПОБ составляет до 80—90% бактериальных и до 60—65% бактериальных липидов [13]. По данным Юшковой с соавт. [11], при проверке синтеза ПОБ *R. lupini* на разных средах максимальное содержание полимера отмечено при выращивании на манните и глутамате.

Запасание энергии, вероятно, основная функция ПОБ в клетках микроорганизмов. Например, у *Bacillus megaterium* полимер служит эндогенным углеродным или энергетическим источником обеспечения процесса спорообразования [15]. Для *Azotobacter vinelandii* установлена прямая связь между количеством полимера и образованием цист [16]. Интенсивность люминесценции у светящихся бактерий и накопление ими ПОБ связаны обратной зависимостью [8]. Показано, что содержание ПОБ в бактериоиде незначительно именно тогда, когда клетки активно фиксируют азот и активно дышат, а значит и потребность их в энергии и восстановительных эквивалентах особенно велика [10]. Ранее нами при работе с чистыми культурами *R. vigna*, *R. japonicum*, *R. phaseoli* и *R. meliloti* были получены данные о зависимости содержания ПОБ от активности нитрогеназы и гидрогеназы. Показана строгая обратная корреляция между активностью нитро-

геназы и содержанием ПОБ в анаэробных условиях роста в присутствии нитратов; вероятно, эта зависимость обусловлена расходом ПОБ на процесс азотфиксации в этих условиях. Между активностью гидрогеназы и содержанием ПОБ установлена прямая корреляция, что, видимо, говорит о том, что наличие водородпоглощающей гидрогеназы дает изученным штаммам энергетический выигрыш в результате вторичного вовлечения молекулярного водорода в метаболизм и тем самым позволяет более эффективно использовать энергию, избыток которой накапливается в виде ПОБ [4]. Количество синтезированного ПОБ может быть стабилизировано при культивировании бактерий в строго определенных условиях и в этом случае может использоваться как четкая количественная характеристика отдельных штаммов *Rhizobium* [5, 9]. Было показано, что ПОБ может служить критерием дифференциации активных штаммов *Rhizobium* от малоактивных. При выращивании *Rhizobium* на бобовом агаре с сахарозой ПОБ накапливается в клетках малоактивных штаммов в гораздо большем количестве, чем в клетках активных штаммов [3, 6]. Нами предложен флуоресцентный экспресс-метод для тестирования активных штаммов *Rhizobium* по окраске ПОБ прижизненным липофильным красителем фосфином 3R при выращивании колоний микроорганизмов на чашках Петри [1, 2]. Учитывая различную потребность клубеньковых бактерий в источниках углерода и азота, возможен и иной подход к решению вопроса об отборе активных штаммов.

Цель настоящей работы — проверить способность разных по активности штаммов некоторых видов быстрорастущих клубеньковых бактерий к синтезу ПОБ при выращивании их на разных источниках углерода и азота.

#### Объекты и методы исследования

В работе использовали следующие культуры клубеньковых бактерий: *R. phaseoli*, штаммы 673 — активный, 680 — малоактивный; *R. meliloti*, штаммы 425a — активный, 434a — неактивный; *R. trifolii*, штаммы 348a — активный, 346a — малоактивный. Все исследованные штаммы получены из коллекции ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии ВАСХНИЛ (г. Пушкин, С.-Петербург). Коллекционные штаммы клубеньковых бактерий поддерживали на гороховой среде (г/л): горох — 50, сахароза — 5,  $K_2HPO_4$  — 0,5, агар — 15, pH 6,8—7,0. В опытах микроорганизмы выращивали на агаризованной синтетической среде состава (мг/л):  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  — 150,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  — 150,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 250, Fe ЭДТА — 28,  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  — 10,  $H_3BO_3$  — 3,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  — 2,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  — 0,25,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  — 0,04,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  — 0,025, KI — 0,78, биотин — 0,01, пантотеновая кислота — 0,1, фолиевая кислота — 0,01,  $B_2$  — 0,2,  $B_1$  — 0,1,  $B_6$  — 0,1,  $B_{12}$  — 0,02, агар «Difco» — 1,5%, вода дистиллированная, pH 7,0. Использовали следующие источники углерода (уравнено по содержанию C): сахароза — 10, глюкоза, арабиноза, маннит — по 10,5, сукцинат Na — 14,35, ацетат Na — 14,5, фумаровая кислота — 10,15 г/л. Источники азота в данной серии опытов  $KNO_3$  — 1 г/л либо  $(NH_4)_2SO_4$  — 0,66.

В серии опытов, где варьировали источники азота (уравнено по азоту) (г/л):  $KNO_3$  — 1,  $(NH_4)_2SO_4$  — 0,66, глутамин — 0,73, глицин — 0,75, аспарагин — 0,66,  $Co(NH_2)_2$  — 0,30; источником углерода служила сахароза — 10 г/л.

Бактерии выращивали в чашках Петри: на поверхность среды в чашку Петри помещали 0,1 мл бактериальной суспензии плотностью по ФЭК 0,5 (кювета № 1, длина оптического пути 1 мм); для получения сплошного равномерного роста на агаре засев проводили шпателем; инкубация — в термостате при 28° в течение 6 сут.

Количественное определение ПОБ проводили ИК-спектрофотометрически с использованием метода Фирордта [7]. Для определения содержания ПОБ в клетках биомассу бактерий смывали с агаризованной среды 15 мл водопроводной воды, измеряли оптическую плотность суспензии на ФЭК-56М при  $\lambda = 550$  нм;

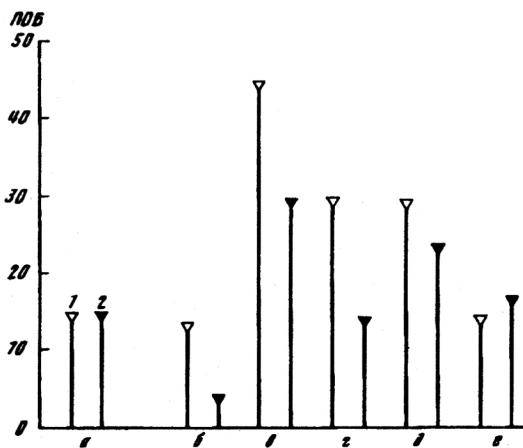


Рис. 1. Содержание поли-β-оксibuтирата в клетках активного (348а) и малоактивного (346а) штаммов *R. trifolii* при росте на разных источниках азота на фоне сахарозы. ПОВ — процент от веса сухих клеток (то же на рис. 2—6); а — KNO<sub>3</sub>, б — (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, в — глутамин, г — мочеви́на, д — аспарагин, з — глицин; 1 — активный штамм, 2 — малоактивный (то же на рис. 2, 3)

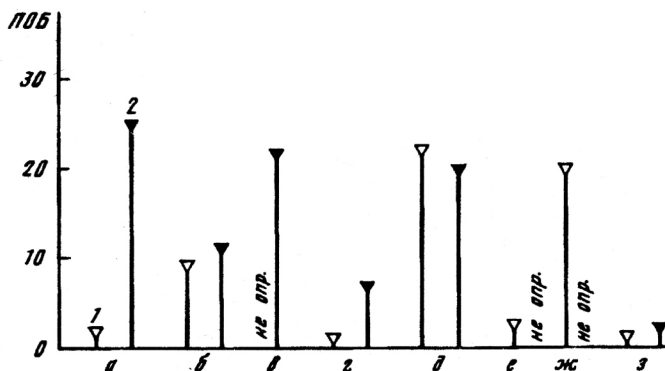


Рис. 2. Содержание поли-β-оксibuтирата в клетках активного (348а) и малоактивного (346а) штаммов *R. trifolii* при росте на разных источниках углерода на фоне NO<sub>3</sub><sup>-</sup> или NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. а — глюкоза, б — арабиноза, в — маннит, г — сукцинат + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, е — фумарат, ж — фумарат + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, з — ацетат

клетки центрифугировали и дважды промывали стерильной водопроводной водой. Отмытую биомассу лиофилизировали, тщательно перемешивали и перемалывали с KBr, затем прессовали таблетки для снятия ИК-спектров. Спектры снимали на спектрофотометре ИК-20 (щелевая программа — 4, скорость регистрации — 160 см<sup>-1</sup>/м).

### Результаты и обсуждение

Из данных, представленных на рис. 1—6, видно, что природа используемых источников углерода и азота для роста исследованных штаммов разных видов клубеньковых бактерий является определяющей как для их роста (таблица), так и для синтеза ПОВ. Максимальное содержание ПОВ зависит от вида культуры. Так, в клетках *R. trifolii* максимальное содержание ПОВ обнаружено при выращивании на сахарозе как источнике углерода и глутамине как источнике азота. Содержание ПОВ у активного штамма при этом выше, чем у малоактивного, и достигает 45% от веса сухих клеток. Существенно ниже содержание ПОВ в

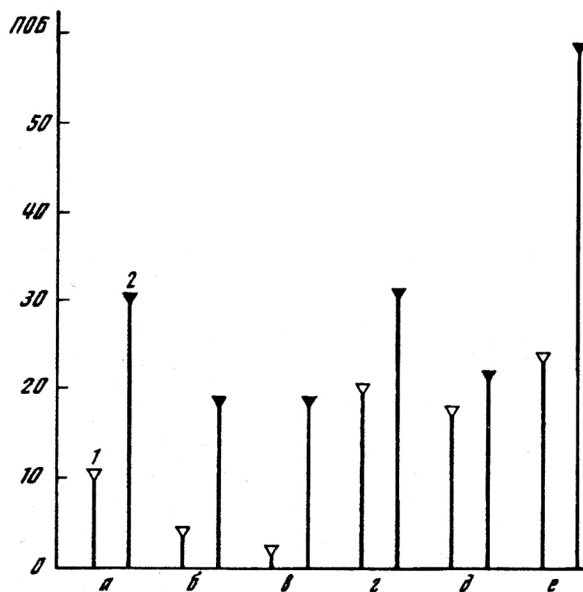


Рис. 3. Содержание поли- $\beta$ -оксибутирата в клетках активного (425а) и неактивного (434а) штаммов *R. meliloti* при росте на разных источниках азота на фоне сахарозы. а —  $KNO_3$ , б —  $(NH_4)_2SO_4$ , в — глутамин, г — мочеви́на, д — аспарагин, е — глицин

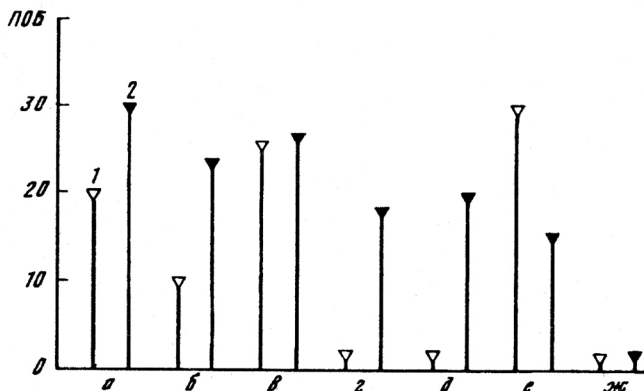


Рис. 4. Содержание поли- $\beta$ -оксибутирата в клетках активного (425а) и неактивного (434а) штаммов *R. meliloti* при росте на разных источниках углерода на фоне  $NO_3^-$  или  $NH_4^+$ . 1 — активный, 2 — неактивный штамм; а — глюкоза, б — арабиноза, в — маннит, г — сукцинат, д — фумарат, е — фумарат +  $NH_4^+$ , ж — ацетат

случае использования органических кислот: сукцината, фумарата и ацетата. При использовании различных комбинаций источников углерода и азота в среде для *R. trifolii* выявлено сочетание, когда содержание ПОБ многократно выше у малоактивного штамма в сравнении с активным: глюкоза и нитрат.

Для группы клубеньковых бактерий люцерны максимальное содержание ПОБ отмечено у малоактивного штамма *R. meliloti* 434а при выращивании на сахарозе и глицине — до 59% от веса сухих клеток. В целом на всех источниках углерода и азота синтез ПОБ более высок у малоактивного штамма *R. meliloti* в сравнении с активным. Однако при использовании фумарата как источника углерода и сульфата аммония как источника азота активный штамм накапливал ПОБ выше,



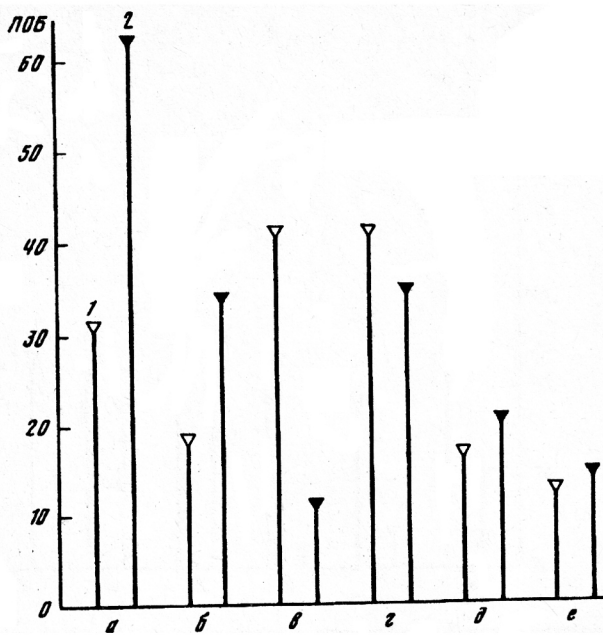


Рис. 5. Содержание поли- $\beta$ -оксибутирата в клетках активного (673) и малоактивного (680) штаммов *R. phaseoli* при росте на разных источниках азота на фоне сахарозы. 1 — активный штамм, 2 — малоактивный; а — KNO<sub>3</sub>, б — (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, в — глутамин, г — мочеви́на, д — аспарагин, е — глицин

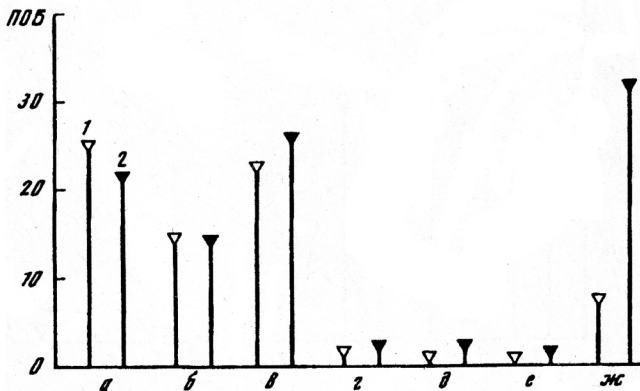


Рис. 6. Содержание поли- $\beta$ -оксибутирата в клетках активного (673) и малоактивного (680) штаммов *R. phaseoli* при росте на разных источниках углерода на фоне NO<sub>3</sub><sup>-</sup> или NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. 1 — активный штамм, 2 — малоактивный; а — глюкоза, б — арабиноза, в — маннит, г — сукцинат, д — фумарат, е — ацетат, ж — фумарат + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

чем малоактивный. Как и в случае с *R. trifolii*, при выращивании *R. meliloti* на средах с органическими кислотами наблюдали низкий уровень накопления ПОБ.

Рассматривая группу *R. phaseoli*, необходимо отметить, что при выращивании малоактивного штамма на сахарозе и нитратном азоте наблюдается самый высокий уровень накопления ПОБ (до 65% от веса сухих клеток) среди всех испытанных в работе штаммов *Rhizobium* при выращивании на разных источниках углерода и азота.

Рост *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. trifolii* на среде с разными источниками углерода и азота (мг сухой биомассы/мл)

Штамм	Источники углерода и азота											
	сахароза	глюкоза	арабиноза	маннит	сукцинат Na	ацетат Na	фумарат Na	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	глютамин	глицин	аспарагин	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>
<i>R. phaseoli</i>	0,46	0,68	0,44	0,59	0,09	0,09	0,03	0,46	3,01	0,11	1,15	2,49
	0,60	0,49	0,28	0,67	0,15	0,006	0,14	0,59	2,44	0,12	1,90	2,28
<i>R. meliloti</i>	0,85	0,58	0,59	0,89	0,28	0,001	0,26	0,05	0,20	0,55	0,52	0,40
	0,85	0,84	0,74	0,88	0,17	0,001	0,15	0,09	0,31	0,73	0,77	0,63
<i>R. trifolii</i>	0,81	0,49	0,99	0,41	0,03	0,001	0,07	0,41	0,91	0,81	2,11	1,46
	0,81	1,59	0,65	0,67	0,02	0,01	0,03	0,29	1,75	1,22	2,15	1,59

Факт, что из всех использованных сахаров и органических кислот максимальное содержание ПОБ наблюдалось на сахарозе для всех исследованных видов клубеньковых бактерий, интересен в свете данных Романова [10], показавшего, что именно сахароза составляет основную долю фотоассимилятов, поступающих из растительной части клубенька в бактериоиды. Иными словами, субстрат, который в природных условиях наиболее энергетически освоен ризобиями, в то же время оказывается и лучшим при запасании ими энергии впрок.

Итак, нами показано, что в зависимости от использованных источников углерода и азота синтез ПОБ можно избирательно индуцировать как у неактивных (что является традиционным), так и у активных штаммов *Rhizobium*. Это дает возможность вести отбор активных штаммов разработанным ранее нами флуориметрическим методом по накоплению ПОБ не малоактивными [1, 2], а активными штаммами *Rhizobium*. Максимальное содержание ПОБ различается у разных видов клубеньковых бактерий. На основании данных, полученных в работе, отобраны штаммы *R. phaseoli*, способные синтезировать полимер до 65% от веса сухих клеток, которые могут быть использованы как продуценты ПОБ при оптимизации условий его синтеза.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бонарцева Г. А. // Микробиология. 1985. Т. 52. Вып. 3. С. 461.
2. Бонарцева Г. А., Мышкина В. Л. // Микробиология. 1985. Т. 54. Вып. 4. С. 661.
3. Бонарцева Г. А., Мышкина В. Л., Мишустин Е. Н. // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1988. № 4. С. 546.
4. Бонарцева Г. А., Мышкина В. Л., Загреба Е. Д. // Микробиология. 1989. Т. 58. Вып. 6. С. 920.
5. Загреба Е. Д., Эйдус Я. А., Якобсон Ю. О. // Биофизика. 1980. Т. 25. С. 172.
6. Загреба Е. Д., Селиверстова Т. И., Гиновска М. К. и др. // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1982. № 6. С. 906.
7. Загреба Е. Д., Савенков В. В., Гиновска М. К., Якобсон Ю. О. // Микробная конверсия. Рига: Зинатне, 1990. С. 139.
8. Калачева Г. С., Высоцкий Е. С., Родичева Э. К., Фиш А. М. // Микробиология. 1981. Т. 50. Вып. 1. С. 79.
9. Мишустин Е. Н., Шильникова В. К. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. М.: Наука, 1973. С. 288.
10. Романов В. И. Азотфиксация и метаболизм фотоассимилятов в клубеньках бобовых растений: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.: Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР. 1987.
11. Юшкова Л. А., Федулова Н. Г., Романов В. И., Кретович В. Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 1975. Т. II. С. 203.
12. Anderson A. J., Dawes E. A. // Microbiol. Revs. 1990. V. 54. P. 450.
13. Gerson T., Patel J. // Appl. Microbiol. 1975. V. 30. P. 193.
14. Lemoigne M. // Bul. Soc. chim. biol. (Paris). 1926. V. 8. P. 770.
15. Slepecky R. A., Law J. H. // J. Bacteriol. 1961. V. 82. P. 37.
16. Stevenson L. B., Socolofsky M. D. // J. Bacteriol. 1966. V. 91. P. 304.
17. Tombolini R., Nutt M. P. // FEMS Microbiol. Lett. 1989. V. 60. P. 299.
18. Vincent J., Humphrey B., North R. // J. Gen. Microbiol. 1962. V. 29. P. 551.

Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН,  
Москва

Поступила в редакцию  
1.XI.1992

Рецензент Н. А. Башкатова

**CONTENT OF POLY- $\beta$ -HYDROXYBUTYRATE IN VARIOUS SPECIES  
OF NODULE BACTERIA DURING GROWTH ON DIFFERENT SOURCES  
OF CARBON AND NITROGEN**

The ability for synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate was tested among *Rhizobium* collection cultures with high and low activity (*R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. trifolii*) during growth on different carbon and nitrogen sources. The possibility was shown to induce the synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by choice either in active or in inactive strains by varying the utilized carbon and nitrogen sources. From the tested strains a potential biotechnological producer of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate was selected. It was a low active strain *R. phaseoli* 680. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate content in the cells of the strain reached 65% of the dry cell weight after growth on sucrose as the carbon source and  $\text{KNO}_3$  as the nitrogen source.