

УДК 631.461.52

СРАВНЕНИЕ СОСТАВА ЖИРНЫХ КИСЛОТ БАКТЕРИЙ *KLEBSIELLA PLANTICOLA* ШТАММА ТСХА-91 И ШТАММА ТСХА-91 RIF²⁰⁰

А.Я. СОКОЛОВА

(Кафедра микробиологии)

Определен состав жирных кислот *KLEBSIELLA PLANTICOLA* штамма ТСХА-91 и штамма ТСХА-91 Rif²⁰⁰ методом газовой хроматографии. Обнаружено, что данные штаммы отличаются наличием ундециловой и маргариновой кислоты у штамма ТСХА-91 Rif²⁰⁰. У штамма ТСХА-91 данных жирных кислот не обнаружено.

В Московской сельскохозяйственной академии им. К.А. Тимирязева на кафедре микробиологии в результате многолетних исследований под руководством профессора В.Т. Емцева был получен штамм *Klebsiella planticola* штамм ТСХА-91, который используется в качестве бактериального удобрения «Биоплант-К» для овощных культур. Кроме того, данный препарат возможно использовать для протекции растений от солевого стресса. [1, 9]. Благодаря особенностям данного штамма этот препарат усиливает рост и развитие растений, снабжая их азотом и ростовыми веществами, защищает корневую систему растений от поражения фитопатогенными грибами. [1,4]. Была изучена нитрогеназная активность *Klebsiella planticola* штамм ТСХА-91, определена способность к ингибированию фитопатогенов [1], однако в настоящий момент биохимические свойства данного микроорганизма мало изучены.

Новые высокочувствительные методы сделали возможным изучение продуктов обмена микроорганизмов.

Представляется интересным изучение спектра жирных кислот *Klebsiella planticola* штамм ТСХА-91. Известно, что жирные кислоты входят в состав фосфолипидов, гликолипидов, глицофосфолипидов, орнитин- и лизинсодержащих липидов, ацилглицеринов, эфиров жирных кислот, липопротеинов и липополисахаридов наружной мембраны грамотрицательных бактерий, некоторых других липидов. Им принадлежит еще мало изученная, но важная роль в биосинтезе ДНК [3]. По составу жирных кислот осуществляют идентификацию микроорганизмов. Длина цепи жирных кислот бактерий в основном составляет 12-19 атомов углерода. У бактерий многих таксономических групп преобладают жирные кислоты с прямой цепью. Из насыщенных жирных кислот в наибольшем количестве содержится пальмитиновая, из ненасыщенных — пальмитолеиновая и цис-вакценовая жирные кислоты [3, 7, 8].

Цель данной работы в сравнительном изучении состава жирных кислот 2 штаммов *Klebsiella planticola* (ТСХА-91 и ТСХА-91 Rif²⁰⁰).

Материалы и методы

Штаммы ТСХА-91 и ТСХА-91 Rif²⁰⁰ *Klebsiella planticola*, полученные из коллекции кафедры микробиологии МСХА им. Тимирязева, культивировали на твердой питательной среде Luria Bertoni 24 ч [1]. *Klebsiella planticola* штамм ТСХА-91 относят к семейству Enterobacteriaceae. Это грамотрицательная, эндобитная ризобактерия. Штамм ТСХА-91 Rif²⁰⁰ — рифампициноустойчивый мутант штамма ТСХА-91, получен последовательной адаптацией к повышенным концентрациям рифампицина, характеризуется нестабильной и более низкой нитрогеназной активностью в отличие от исходного штамма [1].

Хроматографический анализ жирных кислот *Klebsiella planticola* выполнен Г.А. Осиповым. [7]. Клетки с агара в количестве 40-60 мг подвергали кислотному метанолизу в 0,4 мл 1М HCl в метаноле при 80° С в течение 1 ч. В результате метанолиза жирные кислоты освобождаются из липидов клеточной мембраны и липополисахарида клеточной стенки в виде метиловых эфиров. Их двукратно экстрагировали в 200 мкл гексана и упаривали до 60 мкл. Полученную порцию экстракта анализировали на хроматографе Microbial Identification System (Sherlock) фирмы MIDI Inc., Newark, Del, США [11] методом газовой хроматографии (ГХ). Определение вида микроорганизмов осуществлялось автоматически по программе прибора при сопоставлении полученного профиля жирных кислот с базой данных, включающей около 2000 штаммов микроорганизмов, в т. ч. семейства Enterobacteriaceae и видов *Klebsiella*.

Результаты и их обсуждение

Результаты проведенных исследований концентрации жирных кислот *Klebsiella planticola* представлены в табл. 1.

Жирные кислоты *Klebsiella planticola* штамма ТСХА-91 Rif²⁰⁰ и штамма ТСХА-91 характеризуются преобладанием насыщенных жирных кислот (64%). Между двумя штаммами выявлены различия по составу насыщенных жирных кислот. В штамме ТСХА-91 Rif²⁰⁰ содержание ундециловой жирной кислоты составило 0,34%, а маргариновой — 1,27% (табл. 1). В штамме ТСХА-91 данные жирные кислоты отсутствуют.

У изучаемых штаммов *Klebsiella planticola* пальмитиновая жирная кислота привалирует среди насыщенных жирных кислот. Остальные насыщенные жирные кислоты (лауриновая, миристиновая, пентадециловая, пальмитиновая, стеарионовая) являются характерными компонентами микроорганизмов [7, 8]. Различия между двумя штаммами по их содержанию были незначительными.

Ненасыщенные жирные кислоты составили 18%. Из них обнаружена пальмитоолеиновая и цис-вакценовая жирные кислоты (табл. 1). Причем снижение содержания цис-вакценовой кислоты у штамма ТСХА-91 Rif²⁰⁰ на 6,08% возможно связать с резистентностью данного штамма к рифампицину [8].

Гидрокислоты составили 9% от общего количества жирных кислот. Из них выявлена Р-гидроксимиристиновая кислота. Разница в содержании данной кислоты между двумя штаммами незначительная. Она является, главным образом, компонентом липида А липосахаридов грамотрицательных бактерий [7].

В состав липидов *Klebsiella planticola* входит уникальная жирная кислота (циклогептадекановая), относящаяся к циклопропановому типу жирных кислот — 9%. Разница в содержании данной кислоты между двумя штаммами незначительная и составляет 0,01%. Циклопропановые жирные кислоты образуются из мо-

Состав жирных кислот *Klebsiella planticola* штаммы ТСХА-91 Rif²⁰⁰ и ТСХА-91

Вещество		Состав жирных кислот, % от суммы	
краткая формула	полное наименование	<i>Klebsiella planticola</i> штамм ТСХА-91	<i>Klebsiella planticola</i> штамм ТСХА-91 Rif ²⁰⁰
<i>Насыщенные жирные кислоты</i>			
11:0	ундециловая	—	0,34
12:0	лауриновая	4,87	5,04
14:0	миристиновая	6,51	7,60
15:0	пентадециловая	0,71	1,97
16:0	пальмитиновая	29,26	30,02
17:0	маргариновая	—	1,27
18:0	стеариновая	0,89	0,52
<i>Ненасыщенные жирные кислоты</i>			
16:1w7c	пальмитоолеиновая	16,63	18,40
18:1w7c	цис-вакценовая	29,61	23,53
<i>Циклопропановые жирные кислоты</i>			
17сус	циклогептадекановая	7,89	7,88
<i>Гидрокислоты</i>			
3-ОН-14:0	β -гидроксимиристиновая	3,63	3,43

Обозначения веществ: цифра до двоеточия — число атомов углерода; цифра после двоеточия — число двойных связей; латинская буква обозначает углеводородный конец углеродной цепи относительно двойной связи: с-цис изомер; 3-ОН — гидроксигруппу в 3((3)-положении от карбоксильного конца соответственно; символ «сус» обозначает наличие циклопропанового кольца.

ноненасыщенных жирных кислот. Как и их биосинтетические предшественники, они имеют цис-конфигурацию. Циклопропановые жирные кислоты очень редко встречаются у микроорганизмов, так как они характерны для высших организмов, за исключением циклопропановых жирных кислот растений [8]. Необходимо отметить, что наличие циклопропановых жирных кислот характерно для всех видов рода *Klebsiella* и свидетельствует о тесной филогенетической связи, а также о возможном происхождении одних видов бактерий рода *Klebsiella* от других [3].

Степень насыщенности или коэффициент насыщенности жирных кислот [5] — соотношение количества насыщенных жирных кислот к количеству ненасыщенных жирных кис-

лот — выше для штамма ТСХА-91 Rif²⁰⁰ 1,12, чем для классического штамма ТСХА-91 *Klebsiella planticola* 0,91, соответственно ($P < 0,1$) (табл. 2). Наше наблюдение соответствует данным Л. П. Ковальчука [5] и Е. Л. Рубан [8] о преобладании насыщенных жирных кислот и цис-вакценовой кислоты у антибиотикоустойчивых штаммов.

Соотношение количества сумм пальмитоолеиновой и цис-вакценовой жирных кислот к сумме пальмитиновой и стеариновой жирных кислот известно в качестве показателя текучести клеточных мембран [2]. Для штамма ТСХА-91 Rif²⁰⁰ данный показатель был равен 1,53 (100%), а для классического штамма ТСХА-91 *Klebsiella planticola* — 1,37 (85%) соответственно ($P > 0,1$) (табл. 2).

Таблица 2

Сравнение биологически существенных соотношений между количеством ряда жирных кислот *Klebsiella planticola* штамма ТСХА-91 Rif²⁰⁰ и штамма ТСХА-91

Показатель	<i>Klebsiella planticola</i> штамм ТСХА-91	<i>Klebsiella planticola</i> штамм ТСХА-91 Rif ²⁰⁰
	Сумма насыщенных жирных кислот, %	42,24
Сумма ненасыщенных жирных кислот, %	46,24	41,43
Коэффициент насыщенности К.н= =(Σ нас.ж.к./ Σ ненас.ж.к) [8]	0,91	1,12
Сумма 16:1+18:1, %	46,24	41,93
Сумма 16:0+18:0, %	30,15	30,54
$\Sigma(16:1+18:1)/\Sigma(16:0+18:0)$ [9]	1,53	1,34

Необходимо отметить, что наличие цис-вакценовой, ω -гидроксимиристиновой, циклогептадекановой кислот является маркерным признаком семейства Enterobacteriaceae [7].

В данной работе приведен первый анализ жирных кислот *Klebsiella planticola* штаммов ТСХА-91 Rif²⁰⁰ и ТСХА-91. Представляет интерес сравнение полученных данных с банком данных хроматографа Microbial Identification System (Sherlock) фирмы MIDI Inc., Newark, Del, США [11] по жирнокислотному составу других представителей семейства Enterobacteriaceae (*Enterobacter aerogenes*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Echerichia coli*), представленных в табл. 3. По величине родства заметна разница между штаммами ТСХА-91 Rif²⁰⁰ и ТСХА-91 *Klebsiella planticola*. Ранее некоторые авторы обращали внимание на эво-

Таблица 3

Сравнение величин сходства *Klebsiella planticola* штамма ТСХА-91 Rif²⁰⁰ и штамма ТСХА-91 с микроорганизмами по жирнокислотному составу [7]

Название микроорганизма	Сходство по жирнокислотному составу, %	
	<i>Klebsiella planticola</i> штамм ТСХА-91	<i>Klebsiella planticola</i> штамм ТСХА-91 Rif ²⁰⁰
<i>Enterobacter aerogenes</i>	44,7	71,3
<i>Salmonella choleraesuis</i>	38,1	65,3
<i>Salmonella enteritidis</i>	50,2	21,8
<i>Echerichia coli</i>	18,9	—

люционное филогенетическое сходство клебсиелл с эширихиями, шигеллами и сальмонелами, отмечая трудности их сравнительной лабораторной идентификации [3, 6, 10].

Заключение

Как видно из представленных данных мутантный штамм ТСХА-91 Rif²⁰⁰ *Klebsiella planticola* отличается от исходного штамма наличием в своем составе ундециловой и маргаритовой жирных кислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бирюкова О.В. Эндофитная ризобактерия *Klebsiella planticola*, взаимодействие с растением и ценозом микроорганизмов в фитоплане и ризосфере. Канд. дисс. М., 2001, с. 40-140. — 2. Богданов В.В., Смирнов Л.П., Сидоров В.С. Липиды микроорганизмов сем. Vibrionaceae возбудителей заболеваний рыб. — Прикладная биохимия и микробиология, 2001, т. 37, № 3, с. 359-363. — 3. Васюренко З.П., Фролов А.Ф., Смирнов В.В., Рубан Н.М. Жирнокислотные профили

- бактерий, патогенных для человека и животных. Киев.: Наукова думка, 1992, с. 7-235. — 4. *Емцев В.Т.* Ассоциативный симбиоз почвенных diaзотрофных бактерий и овощных культур. — Почвоведение, 1994, № 4, с. 74-84. — 5. *Ковальчук Л.П., Донец А.Т., Бурцева С.А.* Отд. микробиологии. Кишнев: Штиинца, 1979. — 6. *Красноголовец В.Н., Киселева Б.С.* Клебсиеллезные инфекции. М.: Медицина, 1996. — 7. *Осинов Г.А.* Хромато-масс-спектрометрическое исследование микроорганизмов и их сообществ. Докт. дисс. М., 1995. — 8. *Рубан Е.Л.* Микробные липиды и липазы. М.: Наука, 1997. — 9. *Соколова А.Я., Голубкина Н.А., Емцев В.Т., Селицкая О.В.* Влияние бактериального препарата «Биоплант-К» на прорастание, накопление аскорбиновой кислоты и развитие семян газонных трав в стрессовых условиях. — Матер. V Междунар. симп. «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». М., 2001, т. 1, с. 338-340. — 10. *Хоумна Дж., Крига Н., Снита П. и др.* / Пер. с англ. под ред. Г.А. Заварзина. Определитель бактерий Берджи, 9-е изд. М.: Мир, 1997, т. 1, с. 186-187. — 11. *Stead D.E., Sellwood J.E., Wilson J. et al.* — J. Appl. Bacteriol, 1992, 72, pp. 315-321.

*Статья поступила
8 апреля 2004 г.*

SUMMARY

Composition of fatty acids *Klebsiella Planticola* strain TSKha-91 and strain TSKha-91 RIF²⁰⁰ is determined by method of gas chromatography. It has been found that these strains contain undecylenic and margatine acid in strain TSKha-91 RIF²⁰⁰. In strain TSKha-91 these fatty acids have not been found.