УДК 631.46:[547.82+547.857

К МЕТОДИКЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЕТА АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА CLOSTRIDIUM, ИСПОЛЬЗУЮЩИХ ПУРИНОВЫЕ И ПИРИМИДИНОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

БАБАЙЦЕВА В. А., ЕМЦЕВ В. Т., ВИТОЛ М. Я.
(Кафедра микробиологии)

Как известно, анаэробные бактерии рода Clostridium участвуют в разложении не только углеводов и аминокислот, но и пуриновых и пиримидиновых соединений в почве [5, 7, 8]. Однако количественный состав и распространение указанных организмов в почвах изучены еще недостаточно. Это объясняется недоработанностью методов количественного учета Clostridium, трансформирующих пурины и пиримидины.

Нами были проведены опыты по подбору питательных сред для количественного учета этих микроорганизмов. В качестве минеральной основы (МО) всех питательных сред был взят состав из следующих компонентов: Na_2HPO_4 — 0,1%, KH_2PO_4 — 0,05; $MgSO_4$ — 0,05%; $FeSO_4$ — следы, смесь микроэлементов по Федорову 1 мл; дистиллированная вода — 1000 мл.

Среды для количественного учета анаэробов, использующих пиримидиновые соединения

Бактерии рода Clostridium — Cl. uracilicum и Cl. oroticum обладают строгой специфичностью по отношению к пиримидинам [2, 7, 10]. Cl. belfantii и Cl. sartagoformum относятся к неспецифическим анаэробам. Они были выделены на урациле, который использовался микробами в качестве источника азота. Эти виды могут потреблять и пурины [3]. Они относятся к непатогенным видам рода Clostridium; Cl. uracilicum, выделенный на среде с урацилом и дрожжевым экстрактом, нуждается в некоторых углеводах и витаминах. Cl. oroticum, используя оротовую кислоту, может сбраживать углеводы. У этих организмов отсутствует протеолитическая способность, оптимум pH 7,0—7,5. Оптимальная температура развития 35—37° [6].

Для количественного учета анаэробов, использующих пиримидины, был испытан ряд модифицированных нами сред: 1) МО — 1000 мл, витамины по Одинцовой, $CaCO_3$ — 1, урацил — 0,1% [4, 7, 10]; 2) МО — 1000 мл, $CaCO_3$ — 1, урацил — 0,1, дрожжевой автолизат 0,001%, почвенный экстракт из мощного чернозема [8]; 3) МО — 1000 мл, янтарная кислота — 0,1%, глицерин — 0,5, урацил — 0,1, дрожжевой автолизат — 0,001, $CaCO_3$ — 1%; 4) МО — 1000 мл, глюкоза — 0,5%, смесь витаминов по Одинцовой, урацил — 0,1, $CaCO_3$ — 1% [3]; 5) МО — 1000 мл, глюкоза — 0,5%, дрожжевой автолизат — 0,002, урацил — 0,1, $CaCO_3$ — 1%; 6) МО — 1000 мл, картофельно-морковный отвар — 25%; глюкоза — 0,5, дрожжевой автолизат — 0,001, урацил — 0,1, $CaCO_3$ — 0,5% [4].

Среды для количественного учета анаэробов, использующих пуриновые соединения

Cl. acidiurici и Cl. cilindrosporum представляют собой группу специфических анаэробов, выделяемых на среде с мочевой кислотой. Эти анаэробы используют пурины и не нуждаются в дополнительных источниках углерода [6]. Однако пуриновые соединения потребляются также Cl. belfantii и Cl. sartagaformum [3].

Основными продуктами трансформации пуриновых соединений являются уксусная кислота, муравьиновая кислота, масляная кислота, CO_2 и NH_3.

Для количественного учета анаэробов, использующих пуриновые соединения, были испытаны следующие модифицированные нами среды: 7) МО — 1000 мл, витамины по Одинцовой, $CaCO_3$ — 1, аденозин — 0,1%; 8) МО — 1000 мл, янтарная кислота — 0,1%, глицерин — 0,5, аденозин — 0,1, дрожжевой автолизат — 0,001%; 9) МО — 1000 мл, глюкоза — 0,5%, дрожжевой автолизат — 0,002, аденозин — 0,1%; 10) МО — 1000 мл, картофельно-морковный отвар — 25%, глюкоза — 0,5, дрожжевой автолизат — 0,001, аденозин — 0,1%.

Все среды стерилизовали дважды при 0,5 ат (49,0332 кПа) в течение 20 мин. Витамины по Одинцовой (биотин — 0,0002 мкг, инозит — 5,0, пантотенат Са — 0,25, никотиновая кислота — 0,5 мкг на 1 мл среды) вносили в среды стерильно. Окислительно-восстановительный потенциал указанных сред снижали, применяя агар-агар (0,075%), и тиогликолат натрия (0,03%). В среды вносили также окислительно-восстановительный индикатор нейтральрот в концентрации 0,004% [4].

Для сравнительного определения пригодности указанных выше сред при количественном учете клеток почвенных анаэробов, использующих пуриновые и пиримидиновые соединения, была взята дерново-подзолистая почва (опытное поле ТСХА).

Подсчет проводили методом предельных разведений. Разведения почвы (1/10—1/1 000 000) вносили по 1 мл в пробирку с соответствующей средой (размер пробирок 1×25 см). Повторность опыта 2-кратная. Температура инкубации посевов — 37°. Clostridium учитывали каждые сутки в течение 7—10 дней по следующим показателям: наличие газообразования (учитываемые виды образуют в процессе трансформации пуриновых и пиримидиновых соединений CO_2, H_2, NH_3); восстановление нейтральрота (золотисто-желтая флюоресценция среды); наличие клеток, типичных для данного вида бактерий; трансформация внесенных пуриновых и пиримидиновых соединений.

О трансформации судили по изменению химической структуры внесенных пуриновых и пиримидиновых соединений при хроматографическом и спектрофотометрическом анализе.

Анализу подвергалась надосадочная жидкость (после отделения путем центрифугирования бактериальных клеток из пробирок со средами, где наблюдалось развитие анаэробов).

Для того, чтобы установить, является ли та или иная трансформация микробиологической, а не химической, анализировали стерильную среду, которую инкубировали в тех же условиях, что и инокулированные среды.

Контролем для определения адсорбционной способности почвы служили среды с безмикробной (стерильной) почвой. Для стерилизации почвы использовали облучение ^{60}Co, доза радиации 2,0 *М* рад. Разведения стерильной почвы готовили по указанной выше методике. Здесь же определялась возможность ферментативной трансформации пуриновых и пиримидиновых соединений в условиях анаэробиоза.

Хроматографический анализ заключался в разделении продуктов трансформации пуринового или пиримидинового соединения методом

восходящей хроматографии на бумаге Filtrak-II в приводимых ниже системах растворителей.

1. Этилацетат : CH_3COOH : H_2O = 3 : 1 : 1.
2. Изопропанол : H_2O : NH_4OH 25% = 14 : 5 : 1.
3. Н-бутанол : ледяная уксусная кислота : вода = 2 : 1 : 1.
4. Н-бутанол : ацетон : C_3HCOOH : NH_4OH 3% : H_2O = 35 : 25 : 15 : : 15 : 10.
5. Изомасляная кислота : H_2O : 25% NH_4OH = 33 : 66 : 1,5.

Продолжительность хроматографического разделения составляла 24—48 ч в зависимости от использованной системы.

Таблица 1

Соединения, обнаруженные при трансформации урацила и аденозина почвенными анаэробами рода Clostridium

Исходное соединение в среде	Период трансформации, ч		
	24	72	120
Урацил (У)	Урацил	Дигидроурацил (ДГУ) Урацил (У)	Дигидроурацил β-уреидопропионовая кислота Урацил
Аденозин (Ад)	Аденозин	Инозин (Ин) Гипоксантин (Гк) Аденозин (Ад)	Инозин Гипоксантин (Гк) Аденин (А) Аденозин (Ад)
Контроль *	Урацил	Урацил	Урацил
Контроль 2**	Аденозин	Аденозин	Аденозин

* *Среда с урацилом, зараженная стерильной почвой.* ** *Среда с аденозином, зараженная стерильной почвой.*

Пуриновые и пиримидиновые соединения обнаруживали на хроматограммах по поглощению УФ-лучей при помощи ультрахемископа [1].

Дегидросоединения обнаруживали при обработке хроматограмм 0,5 н. раствором NaOH, а образовавшиеся уреидосоединения проявляли п-диметилбензоальдегидом [9].

Идентификацию выделенных и очищенных соединений проводили путем сравнения *Rf*-соединений в различных системах с *Rf*-образцами заведомо известных структур, а также по характеру УФ-спектра. Для этого снимали спектры УФ-поглощения водных элюатов очищенных и выделенных соединений при pH 1 и pH 11 на спектрофотометре Specord UV-Vis (ГДР).

Хроматографический анализ инокулированных почвой питательных сред с урацилом выявил трансформацию этого соединения после 72-часового их культивирования. Было обнаружено и идентифицировано новое соединение — дигидроурацил. После 120 ч инкубации отмечено появление еще одного соединения — β-уреидопропионовой кислоты.

В средах с аденозином через 72 ч культивирования обнаружены инозин и гипоксантин, а через 120 ч — аденин (табл. 1 и 2). При инокуляции сред стерильной почвой трансформации урацила и аденозина не было выявлено.

Следовательно, последний показатель (трансформация гетероциклических соединений) может служить при количественном учете бактерий весьма надежным критерием роста и развития анаэробов, использующих пуриновые и пиримидиновые соединения.

Таблица 2

Хроматические и спектрофотометрические характеристики обнаруженных в средах соединений

Обнаруженные соединения	В системах					УФ-поглощение, нм		Идентификация обнаруженных соединений
	1	2	3	4	5	pH 1	pH 11	
	Исходное соединение — урацил							
$У_1$	0,74	0,58	0,55	0,54	0,74	259	284	Урацил
$У_2$								
$У_3$	Обнаружены при обработке парадиметилбензоальдегидом							Дигидроурацил β-уреидопропионовая кислота
	Исходное соединение — аденозин							
X_1	0,59	0,65	0,60	0,64	0,89	257	260	Аденозин
X_2	0,45	0,51	0,40	0,55	0,63	248	260	Инозин
X_3	0,68	0,69	0,68	0,62	0,74	248	258	Гипоксантин
X_4	0,69	0,70	0,68	0,63	0,68	263	269	Аденины

Количество клеток этих Clostridium подсчитывали по таблицам Мак Креди.

Результаты сравнительного испытания пригодности различных сред для количественного учета пуринолитических Clostridium показали (табл. 3), что число клеток бактерий, выявляемых на средах с пуриновыми и пиримидиновыми соединениями при дополнительном

Таблица 3

Сравнительное испытание питательных сред для количественного учета Clostridium, использующих пиримидиновые и пуриновые соединения

Питательная среда для анаэробов, использующих пиримидины	Количество клеток на 1 г абсолютно сухой дерново-подзолистой почвы, тыс.	Питательная среда для анаэробов, использующих пурины	Количество клеток на 1 г абсолютно сухой дерново-подзолистой почвы, тыс.
1 — синтетическая среда с урацилом + смесь витаминов по Одинцовой	0,79	7 — синтетическая среда с аденозином + смесь витаминов по Одинцовой	0,38
2 — то же+дрожжевой автолизат+почвенный экстракт из мощного чернозема	0,82	8 — то же+янтарная кислота+глицерин+дрожжевой автолизат	2,94
3 — то же+янтарная кислота++глицерин+дрожжевой автолизат	7,2	9 — то же+глюкоза+дрожжевой автолизат	7,3
4 — то же+глюкоза+смесь витаминов по Одинцовой	29,8	10 — то же+глюкоза+дрожжевой автолизат+картофельно-морковый отвар	8,4
5 — то же +глюкоза+дрожжевой автолизат	29,3		
6 — то же+глюкоза+дрожжевой автолизат+картофельно-морковный отвар	32,0		

источнике углерода, превышало в десятки и сотни раз число клеток анаэробов, выявляемых на средах без дополнительных источников углерода. По имеющимся данным, глюкоза улучшает рост аэробных бактерий, выделяемых на пуринах. Она усиливает рост и таких видов анаэробов, как Cl. oroticum и Cl. uracilicum [7, 10]. Подобные факты отмечают и другие авторы [3]. Синтетические среды, где пуриновые и пиримидиновые соединения служили единственным источником угле-

рода и азота, оказались малопригодными для количественного учета анаэробов.

Из испытанных сред для учета клеток анаэробов, использующих пиримидины, наилучшей была синтетическая среда с урацилом и глюкозой, обогащенная картофельно-морковным отваром (№ 6), а для анаэробов, использующих пурины, — синтетическая среда с аденозином и глюкозой, также обогащенная картофельно-морковным отваром (№ 10). Близкие результаты были получены и с питательными средами без картофельно-морковного отвара, но обогащенные либо смесью витаминов, либо дрожжевым автолизатом (№ 4 и 5 для анаэробов, потребляющих урацил, и № 9 для анаэробов, использующих аденозин).

Заключение

Подобраны обогащенные витаминами синтетические питательные среды с урацилом и глюкозой для количественного учета анаэробов, использующих пиримидины, и обогащенные витаминами среды с аденозином и глюкозой для учета анаэробов, потребляющих пурины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блумберг Е. М. Прибор для хроматографического анализа в ультрафиолетовых лучах. «Докл. АН СССР», 1950, т. 72, с. 885—891. — 2. Баркер Х. Брожение азотистых органических соединений. В кн.: Метаболизм бактерий. М., ИЛ, 1963, с. 186—199. — 3. Дунцис М. Э. Условия культивирования анаэробных микроорганизмов из рода Clostridium, выделенных на средах с пиримидиновыми соединениями. «Науч. докл. высшей школы». Биолог. науки, 1972, № 8, с. 100—104. — 4. Емцев В. Т. Методы количественного учета различных видов маслянокислых и ацетонобутиловых бактерий в почве. «Докл. ТСХА», 1965, вып. 109, с. 123—127. — 5. Barker H. A., Back I. V., "J. Biol. Chem.", 1941, vol. 141, p. 3—27. — 6. Berger's manual of determinative bacteriology 1968, 7 ed (Baltimore, Williams, Wilking Co). 7. Campbell L. L. "J. Bacteriology", 1957, vol. 73, p. 220—224. —8. Durand Gilbert. Contribution a l'etude de la Biologie du sol: sur le catabolisme des acides Nucleues et Len derives. These de doctorat es sciences. Toulouse, 1966. — 9. Fink R. M. e. a. Feder. Proc. 1954, vol. 13, p. 207—216. — 10. Wachsman I. T., Barker H. A. "J. Bacteriol.", 1954, vol. 68, p. 400—404.

Статья поступила 13 июня 1977 г.

SUMMARY

Synthetic nutrient media with uracil and glucose enriched with vitamins have been selected for the quantitative estimation fo the anaerobes using pyrimidines; for estimating the anaerobes consuming purines the media with adenosine and glucose enriched with vitamins have been used.