

УДК 573.96.086.83:612.017.1

В.Н.Леонтьев, доцент;
Н.А.Белясова, ст.преп.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА БЫСТРОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ЭТАНОЛПРОДУЦИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Rapid method to detection of ethanol-producing microorganisms in cell populations was developed. The method is based on alteration the colour of clones on solid media after processing them of alcoholdeh drogenase and nitrotetrazolium blue solutions.

Одним из важных направлений совершенствования микробиологических методов производства этанола остается поиск новых перспективных штаммов микроорганизмов и конструирование сверхпродуцентов. Однако существует проблема быстрого выявления таких организмов, поскольку признак этанолаобразования не является селективным и не может служить фактором отбора. Известные методы определения способности клеток продуцировать спирт основаны на детекции конечного продукта в культуральной жидкости [1] или выделяющегося в эквимоллярных количествах углекислого газа [2]. При этом необходимыми являются стадии расчистки вновь выделенных клонов, наращивания биомассы, ферментации, подготовки образцов для анализа и собственно анализ. Перечисленные операции выполняются для всех анализируемых клонов, большая часть которых вообще может не образовывать этанол (при выделении продуцентов из внешней среды) или образуют его в тех же пределах, что и родительские штаммы (при селекционной работе).

Цель настоящей работы состоит в разработке экспресс-метода выявления спиртообразующих микроорганизмов на основании идентификации их по морфологическим признакам.

Наиболее часто для дифференциации микроорганизмов по морфологическим признакам используются плотные диагностические среды, содержащие индикаторы, меняющие свой цвет и окраску колоний, состоящих из клеток с измененными свойствами [3]. Одной из групп таких индикаторов являются соли тетразолия, которые представляют собой светло-желтые, растворимые в воде соединения, окисляющие в присутствии следов щелочи альдозы, кетозы и другие α -кетолы, восстанавливаясь при этом до интенсивно окрашенных диформазапов. Эта реакция

положена в основу определения дегидрогеназ в тканях [4].

В первой серии экспериментов подбирали условия реакций, позволяющих регистрировать изменения окраски растворов, содержащих тетразолий и этанол в разных концентрациях. Предполагали, что ацетальдегид и $\text{NADH} \cdot \text{H}^+$, образующиеся из этанола и NAD^+ в присутствии алкогольдегидрогеназы, будут восстанавливать нитротетразолий синий до формазана.

Действительно, в стандартных растворах этанола (0,12-1,0%) после добавления перечисленных компонентов и нитротетразолиевого синего развивалось голубое окрашивание, интенсивность которого коррелировала с концентрацией спирта.

Схема оптимизированного эксперимента включала следующее:

- 1) внесение в 1 мл водного раствора этанола 0,1 мл алкогольдегидрогеназы (активность 2,0 ФЕ/мг, разведение 1:10);
- 2) добавление к смеси 0,1 мл 15М раствора NAD^+ ;
- 3) добавление 1,5 мл калий-фосфатного буфера ($1 \cdot 10^{-3}$ М, рН 9,5) и 0,3 мл дистиллированной воды;
- 4) инкубирование смеси 10 мин при 30°C;
- 5) добавление 0,02 мл $\text{N}, \text{N}, \text{N}', \text{N}'$ -тетраметилэтилендиамина;
- 6) внесение 0,1 мл раствора нитротетразолиевого синего (0,5%).

Интенсивность окраски регистрировали спектрофотометрически при $\lambda = 505$ нм через 30 мин выдерживания смеси при 30°C.

Положительные результаты экспериментов со стандартными растворами этанола позволили перейти к разработке условий определения этилового спирта в культуральной жидкости исследуемых микроорганизмов. Клетки образующих и не образующих этанол дрожжей и бактерий из коллекции кафедры (всего 15 видов) инкубировали в жидких средах (рН 6,0-7,0) в течение суток. По 10 мкл культуральной жидкости каждого штамма вносили в лунку микрокамеры для иммунологических реакций, а затем обрабатывали из пульверизатора растворами алкогольдегидрогеназы, NAD^+ , ТМЕДа и нитротетразолиевого синего в той же последовательности и концентрациях, как указано выше. Закрывали микрокамеру крышечкой и инкубировали при 30°C. Через 40 мин наблюдали появление сине-голубого окрашивания в лунках с культуральными жидкостями спиртообразующих штаммов (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pachyzolen tannophilus*, *Torulopsis* sp.). Культуральные жидкости дрожжей и бактерий, неспособных сбраживать субстрат в этанол

(11 видов), не меняли свой цвет.

Таким образом отработанная методика позволяет быстро выявлять спиртообразующие культуры из множества за одно определение. Однако она остается все еще трудоемкой (необходима стадия ферментации) и предполагает расходование дорогостоящих реактивов. Представлялось целесообразным изучить возможность применения найденной тест-реакции для анализа микроорганизмов на плотной среде. При этом исходили из предпосылки, что нитротетразолиевый синий проникает в клетки микроорганизмов [5] и реакция его восстановления осуществляется внутри клеток с эндогенными восстановителями.

Для проверки этого предположения высевали на чашку Петри с агаризованной средой 2 штамма: *Saccharomyces cerevisiae* (продуцент этанола) и *Candida scottii* (не образуют этанол) штрихом до изолированных колоний. Посевы инкубировали 24 часа при 30°C. Затем чашки обрабатывали из пульверизатора нитротетразолиевым синим (0,5%) и оставляли при 30°C для развития окраски. Через 20 мин наблюдали окрашивание среды в светлоголубой цвет, на фоне которого колонии обоих штаммов выделялись более интенсивной сине-голубой окраской. Неспецифичность реакции можно объяснить присутствием в среде редуцирующих веществ, а в клетках - $NADH \cdot H^+$, $NADPH \cdot H^+$ и других соединений, способных восстанавливать нитротетразолиевый синий.

Логично предположить, что предварительная обработка посевов раствором алкогольдегидрогеназы приведет к образованию дополнительного количества восстановителей. Поэтому при последующей реакции с нитротетразолиевым синим клоны спиртообразующих микроорганизмов должны окраситься в более интенсивный синий цвет, чем неспиртообразующие. Для проверки данного предположения выросшие клоны дрожжей обрабатывали из пульверизатора раствором алкогольдегидрогеназы (2 Ф^г/мл, разведение 1:10) и спустя 20 мин - раствором нитротетразолиевого синего (0,5%).

Результаты данного эксперимента оказались неожиданными: клоны дрожжей *S. cerevisiae* остались неокрашенными, а колонии *C. scottii*, как и в предыдущем эксперименте, приобрели синий цвет. Анализ 15-ти коллекционных штаммов микроорганизмов с помощью данного метода на плотной среде подтвердил тот факт, что клетки спиртообразующих клонов после обработки алкоголь-

дегидрогеназой и нитротетразолиевым синим остаются неокрашенными.

С помощью данного метода осуществляли скрининг микроорганизмов накопительных культур с целью выявления продуцируемых этанол штаммов из внешней среды. Для этого высевали пробы накопительных культур шпательом до изолированных колоний на глюкозосолевою среду Ридер с дрожжевыи экстрактом и через 48 ч инкубирования обрабатывали посеви описанным выше способом. В результате колонии микроорганизмов на чашке окрашивались в сине-голубые цвета разной интенсивности. Клоны каждого типа окраски отбирали, расчищали и анализировали по спиртообразующей способности стандартным методом ГХХ (хроматограф "Автохром"). Выявлена четкая зависимость: спиртообразующие микроорганизмы формируют только неокрашенные клоны.

Таким образом разработан метод, с помощью которого появляется возможность из большой популяции клеток отбирать редкие, способные к спиртообразованию (формирующие неокрашенные клоны при соответствующей обработке). На одной чашке таким способом можно проанализировать одновременно порядка 100 клонов.

Варьируя концентрации алкогольдегидрогеназы и нитротетразолиевого синего, а также время обработки, можно добиваться изменения интенсивности окраски клонов на чашке, т.е. появляется возможность создавать при селекции более продуктивных штаммов светлоголубой фон (колонии дикого типа), на котором клоны сверхпродуцентов этанола должны выглядеть неокрашенными.

ЛИТЕРАТУРА

1. Goel S.C., Panment N.B. Direkt injection technique for gas chromatographic determination of ethanol // Biotech.Lett.-1984.-Т.6.-Р.177-192.
2. Бабьева И.П., Голубев В.И. Методы выделения и идентификации дрожжей.-М.: Пищ.пром., 1979.
3. Дж.Миллер Эксперименты в молекулярной генетике.-М.: Мир, 1976.
4. Физер А., Физер М. Реагенты для органического синтеза.- М.: Мир, 1970.
5. Общая органическая химия, т.8/ Под ред.Кочеткова Н.К.- М.: Химия, 1985.