



Институт экологии и генетики  
микроорганизмов УрО РАН  
Лаборатория алканотрофных  
микроорганизмов

REGIONAL SPECIALISED  
COLLECTION OF  
  
ALKANOTROPHIC  
MICROORGANISMS



## Идентификация актинобактерий рода *Rhodococcus* экологически значимых видов на основе определения свободных жирных кислот

Состав жирных кислот в значительной мере зависит от возраста бактериальной культуры, условий ее выращивания – состава среды, pH, температурного режима. Однако при строгом соблюдении общих требований к выращиванию культур, высокой стандартизации условий культивирования микроорганизмов и стандартизации исследуемого материала (целесообразно использовать для анализа жирных кислот клетки, находящиеся в стационарной фазе роста) качественный состав групп жирных кислот достаточно постоянен. Выполнение этих правил полностью зависит от исследователя и должно быть под его постоянным контролем.

Спектр жирных кислот бактерий отдельных видов может быть настолько характерным, что определение его не составляет сомнений в видовой принадлежности культур. Однако нередко представители разных видов одного и того же рода или даже разных родов имеют сходные жирнокислотные профили. В рамках полифазной таксономии анализ жирных кислот бактериальных клеток часто полезен в качестве экспрессного и относительно недорогого метода, позволяющего сравнивать и группировать большое количество штаммов с минимальными усилиями и затратами, получать наглядную информацию по характеристике и идентификации бактериальных культур.

По данным сотрудников лаборатории алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (*Ivshina et al., Microbiology (in Russ). 1994. 64:118–128*), актинобактерии рода *Rhodococcus*, независимо от их видовой принадлежности, характеризуются повышенным содержанием пальмитиновой ( $C_{16:0}$ ), пальмитолеиновой ( $C_{16:1}$ ) и олеиновой ( $C_{18:1}$ ) кислот, а также неизменным присутствием туберкулостеариновой ( $10MeC_{18:0}$ ) кислоты. Преобладающие компоненты жирнокислотного пула родококков – насыщенные прямоцепочечные (от 43,7 до 68,0% общего количества обнаруживаемых жирных кислот) с четным числом (от 73,9 до 98,1%) углеродных атомов кислоты.

При этом спектр жирных кислот штаммов родококков, принадлежащих к различным видам, представляет довольно сложную композицию, тогда как качественный состав их почти идентичен. Существенные различия выявляются, прежде всего, в количественном соотношении индивидуальных кислот. Так, по соотношению миристиновой ( $C_{14:0}$ ) и пентадекановой ( $C_{15:0}$ ) кислот родококки экологически значимых видов подразделяются на две группы. Для родококков группы I (*R. erythropolis*, *R. rhodochrous*, *R. ruber*) характерно отношение  $C_{14:0}$  и  $C_{15:0}$  кислот больше единицы, группы II (*R. opacus*) – меньше единицы.

Для представителей *R. erythropolis* типичным является присутствие (от 2,5 до 3,9%) “маркерной” циклопропановой жирной кислоты C<sub>17v</sub>. Этот признак отличает их от штаммов всех других экологически значимых видов родококков, у которых данная кислота не обнаруживается. Другая отличительная особенность культур *R. erythropolis* – повышенное содержание миристиновой (C<sub>14:0</sub>) и туберкулостеариновой кислот.

Сопоставление жирнокислотных профилей трудно дифференцируемых таксонов *R. rhodochrous* и *R. ruber* выявляет их отличительные особенности. Так, представители *R. ruber* успешно различаются по минимальному (3,4%) процентному содержанию туберкулостеариновой кислоты и ее гомологов (10MeC<sub>16:0</sub>, 10MeC<sub>17:0</sub>) по сравнению с таковым у *R. rhodochrous* и *R. erythropolis* (9,7 и 10,8%, соответственно). Своеобразие жирнокислотного спектра представителей *R. oracus* проявляется в высоком (10,1%) показателе суммарных количеств туберкулостеариновой кислоты и ее гомологов. По жирнокислотным профилям не удается однозначно дифференцировать изоляты *R. fascians*. Однако замечено, что они характеризуются самым высоким (до 35,6%) уровнем пальмитиновой кислоты.

Выявленные особенности жирнокислотного клеточного пула родококков использованы для построения частной таксономической системы, позволяющей дифференцировать *Rhodococcus* на видовом уровне.

### **Определение свободных жирных кислот у родококков экологически значимых видов**

**1. Объект исследования.** Реакционная смесь общих липидов клеток природных изолятов и коллекционных культур родококков разных видов после щелочного гидролиза.

**2. Реагенты.** Смесь абсолютный метанол– вода (9:1). Фенолфталеин 1%-ный раствор в 90%-ном эталоне. 6н HCl. Петролейный эфир (40–70°C). 2,5%-ный раствор хлористого водорода в метаноле. Стандартная смесь метиловых эфиров жирных кислот (“SUPELCO”, США).

**3. Материалы.** Колба круглодонная с боковым отводом. Одноканальный механический дозатор переменного объема (рабочий объем–5 мл) с набором наконечников. Делительная воронка. Колба с притертой крышкой. Вакуум-эксикатор. Резиновые перчатки. Защитные очки.

#### **4. Методика.**

**4.1. Получение клеточных экстрактов.** 50 мг сухой биомассы + 3,75 мл смеси хлороформ – метанол (2:1) оставляют на 2 ч при энергичном встряхивании.

**4.2. Получение суммарных неочищенных липидов.** Хлороформ-метанольные экстракты центрифугируют (3000 об/мин, 15 мин) для осаждения бактериальных клеток. Супернатант фильтруют через бумажный фильтр в другую центрифужную пробирку. Для повторного экстрагирования бактериальные клетки снова суспендируют в 4,75 мл смеси хлороформ – метанол – вода (1:2:0,8), смесь встряхивают и центрифугируют. К объединенному супернатанту прибавляют 2,5 мл хлороформа и 2,5 мл воды; хлороформный и водно-метанольный слои разделяют центрифугированием (3000 об/мин, 15 мин). Нижний хлороформный слой декантируют в предварительно взвешенную колбу со шлифом, разбавляют равным объемом бензола и упаривают досуха в токе азота на роторном испарителе при 30–35°C. После выпаривания колбу помещают в вакуум-эксикатор с КОН до установления постоянного веса. Колбу с осадком неочищенных суммарных

липидов взвешивают с помощью аналитических весов. После взвешивания липиды заливают смесью хлороформ – метанол (2:1).

**4.3. Определение свободных жирных кислот.** Аликвотную часть раствора, содержащую 15–30 мг суммарных неочищенных липидов переносят в колбу с боковым отводом, прибавляют 5,0 мл 0,3N метанольного раствора NaOH. Смесь кипятят, после кипячения охлаждают в течение 2 часов. К реакционной смеси общих липидов добавляют 3 капли раствора фенолфталеина и 90%-ный раствор метанола с таким расчётом, чтобы раствор продуктов реакции заполнил весь объём бокового отростка колбы. В результате добавления фенолфталеина смесь окрашивается в малиновый цвет, что свидетельствует об успешном проведении щелочного гидролиза. Полученный раствор переливают в делительную воронку, и порционно (3–4 раза по 5 мл) приливают петролейный эфир для экстракции неомыляемых веществ (алкен-1-иловые эфиры глицерина, стерины, углеводороды, каротиноиды, высшие спирты и др.). Верхний слой (неомыляемые вещества) постоянно сливают в предварительно взвешенную колбу с притёртой крышкой. Водно-спиртовую фазу (нижний слой) подкисляют 6н HCl (0,3 мл) до обесцвечивания раствора и экстрагируют свободные жирные кислоты, порционно (3–4 раза по 5 мл) приливая петролейный эфир. Верхний слой (свободные жирные кислоты) постоянно сливают в предварительно взвешенную колбу с притёртой крышкой.

Объединённые экстракты неомыляемых веществ, а также свободных жирных кислот упаривают досуха в токе азота, сушат в вакуум-эксикаторе над NaOH. Остаток взвешивают и определяют содержание полученных веществ по формулам:

Содержание клеточных жирных кислот, % = (Вес жирных кислот, мг / Вес образца, мг) x 100.

Содержание неомыляемых веществ, % = (Содержание неомыляемых веществ, мг / Вес образца, мг) x 100.

Полученный препарат свободных жирных кислот заливают свежеприготовленной смесью хлороформ метанол (2:1) и хранят при температуре -4°C неограниченное время.

Для идентификации свободные жирные кислоты переводят в метиловые эфиры с помощью кислотного гидролиза (2,5%-ный раствор хлористого водорода в метаноле, 60 °C, в течение одного часа) и анализируют на газовом хроматографе Agilent 6890N с квадрупольным масс-спектрометром “Agilent MSD 5973N” (“Agilent Technologies”, США). Для анализа используют капиллярную колонку RTX-5MS (30 м/0,25 мм/0,25 мкм с 5-ти метровой предколонкой). Кислоты идентифицируют путем сравнения характеристик удерживания неизвестных метиловых эфиров жирных кислот бактерий с таковыми стандартных метиловых эфиров жирных кислот.

**5. Общие требования безопасности при выполнении работы.** Все операции проводить в вытяжном шкафу, обязательно в резиновых перчатках. Особое внимание и осторожность проявлять при работе с соляной кислотой и смесью спирта с хлороформом (глаза обязательно должны быть защищены очками). Рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для обработки рабочего стола использовать 0,5–3% -ный водный раствор хлорамина.

**6. Оформление результатов.** На основе полученных результатов с помощью Ключа для определения видов родококков осуществить группирование

штаммов по данным жирнокислотного состава и сделать выводы о видовой принадлежности исследованных культур.

## 7. Ключ для определения родококков экологически значимых видов

1. Отношение концентраций миристиновой кислоты  $C_{14:0}$  к концентрации пентадекановой кислоты  $C_{15:0}$  больше единицы – *R. erythropolis*, *R. rhodochrous*, *R. ruber*.

А. Циклопропановая жирная кислота  $C_{17\gamma}$  присутствует – *R. erythropolis*.

Б. Процентное содержание туберкулостеариновой кислоты  $10MeC_{18:0}$  и ее гомологов  $10MeC_{16:0}$ ,  $10MeC_{17:0}$  минимальное, меньше 3 – *R. ruber*.

В. Процентное содержание туберкулостеариновой кислоты  $10MeC_{18:0}$  и ее гомологов  $10MeC_{16:0}$ ,  $10MeC_{17:0}$  высокое, больше 9 – *R. rhodochrous*.

2. Отношение концентрации миристиновой кислоты  $C_{14:0}$  к концентрации пентадекановой кислоты  $C_{15:0}$  меньше единицы – *Rhodococcus sp.*, *R. opacus*.

А. Процентное содержание туберкулостеариновой кислоты  $10MeC_{18:0}$  и ее гомологов  $10MeC_{16:0}$ ,  $10MeC_{17:0}$  меньше 4 – *Rhodococcus sp.*

Б. Процентное содержание туберкулостеариновой кислоты  $10MeC_{18:0}$  и ее гомологов  $10MeC_{16:0}$ ,  $10MeC_{17:0}$  больше 10 – *R. opacus*.

## 8. Литература

**Bligh E.G., Dyer W.J.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:1090–1098.

**Ившина И.Б.** Большой практикум «Микробиология»: учебное пособие. 2013. СПб.: Проспект Науки. 112 с.

**Ившина И.Б.** и др. 1994. Методы консервации культур *Rhodococcus spp.* и их применение в практике поддержания специализированного фонда алканотрофных родококков. *Микробиология.* **63**(1):118–128.

**Knoppenstedt R.M.** Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. 1985. *In*: M. Goodfellow, D.E. Minnikin (Eds.). *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Academic Press. London, UK. P. 173–199.