



УДК 574:577.1:551.464(001.8)

**В. П. Чекалов**, м.н.с.

Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского Национальной академии наук Украины, г. Севастополь

### **ЭФФЕКТ РЕВЕРСНОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ ОКРАСКИ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО И ВОЗМОЖНОСТИ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ**

Для исследований дегидрогеназной активности предложено использовать эффект увеличения оптической плотности метиленового синего при контакте проб, прошедших через предварительную анаэробную экспозицию, с кислородом воздуха. Рассмотрена возможность его применения для интегральной оценки функциональной активности микробиальных популяций.

**Ключевые слова:** метиленовый синий, дегидрогеназная активность, бактериобентос, Чёрное море

Окислительно-восстановительные реакции являются тем механизмом, посредством которого в живых клетках осуществляется перенос электронов и протонов водорода от субстрата (т.е. донора) на окислитель – их акцептор. Первые компоненты в цепи ферментов – дегидрогеназы, конечным же акцептором обычно выступает кислород. Определение темпа биохимического потребления кислорода (БПК) широко используется в исследованиях как природных, так и искусственных экосистем в качестве интегрального критерия эффективности функционирования электрон-транспортных цепей и в целом физиологической активности бактериальных сообществ. Обычно его интенсивность связывают с уровнем органического загрязнения среды и, соответственно, потенциальной способностью к самоочищению. Наряду с прямым измерением БПК аналогичную информацию получают также с помощью редокс-красителей, способных в анаэробных условиях заменять кислород в качестве акцепторов электронов. Первоначально применение указанных красителей было преимущественно связано с качественным определением наличия в тканях дегидрогеназ. В настоящее время для количественного анализа дегидрогеназной активности используют производные солей тетразолия, восстановленные продукты которых, как правило, красной окраски, накапливаются во внутриклеточном пространстве [7, 8, 9]. Их извлечение достаточно трудоёмко и предполагает только завершение эксперимента. Кроме того, нелинейный характер процесса, как во времени, так и при различных степенях раз-

бавления исходной пробы, затрудняет выбор оптимальных значений этих параметров. Ранее нами была предложена методика определения сорбционной способности и дегидрогеназной активности донных отложений с помощью метиленового синего (МС) [5]. Однако высокое содержание редуцирующих веществ и низкий окислительно-восстановительный потенциал некоторых грунтов, например сульфурет, обуславливают угнетение дегидрогеназной активности до уровня разрешения методики.

С целью устранения возможного восстановления индикаторного красителя указанными соединениями мы предлагаем использовать эффект реверсного восстановления оптической плотности рабочего раствора метиленового синего. Ход эксперимента предполагает первоначальную анаэробную инкубацию проб с МС. Это фаза частичной адсорбции и восстановления МС как в биохимических цепях, так и за счёт побочных физико-химических процессов. Второй этап – аэробный, запускает процесс переброски электронов с восстановленных молекул красителя на  $O_2$ . В данном случае промежуточным субстратом выступает МС, а скорость процесса зависит непосредственно от особенностей энергетических цепей микроорганизмов. Возможность непрерывной регистрации активности электрон-транспортной системы позволяет точно определять тот временной интервал, когда процесс приобретает линейный характер, что обеспечивает более точный расчёт скорости реокисления МС.

**Материал и методы.** В качестве материала в Севастопольской бухте в зимний период были отобраны образцы донных отложений, различающиеся по физико-химическим показателям: №1 – крупнозернистый песок с высоким содержанием створок моллюсков, Eh=+270 мВ; №2 – глинистый мелкодисперсный ил с тёмными восстановленными участками, Eh= -220 мВ.

Навеску пробы 12 г разводили в соотношении 1:1 в разбавленном стандартном мясо-пептонном бульоне (1:10) с последующим центрифугированием при 3000 об. 5 – 10 мин (рис. 1).

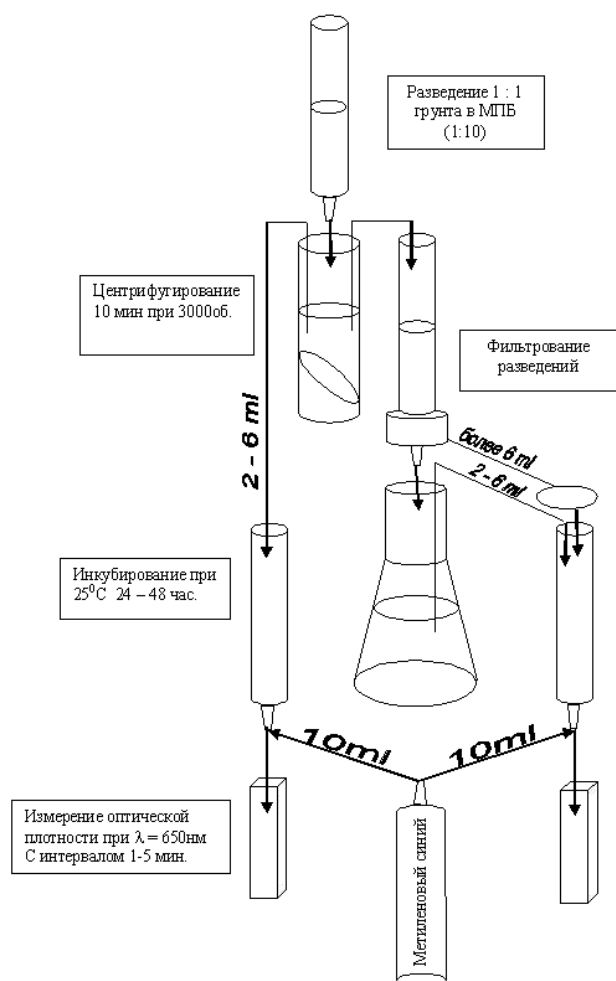


Рис. 1 Схема определения биохимического реокисления лейкоформы метиленового синего

Fig. 1 The scheme of definition of biochemical reoxidation of colorless form methylene blue

Для дальнейшего пересчёта на грамм влажного или сухого грунта большее значение имеет степень разведения пробы. Центрифугирование применяют с целью осаждения взвеси минеральных частиц, затрудняющих фотометрию. При исследовании воды центрифугировать пробы нет необхо-

димости. Разрешение методики в восстановленных средах, обеднённых кислородом, а также в воде можно было бы повысить, увеличив навеску пробы (объём), но при этом ухудшаются оптические характеристики, что затрудняет фотометрический учёт результата. Поэтому было предложено в случае низкой бактериальной активности, концентрировать пробы на мембранных ультрафильтрах, с диаметром пор 0.2 мкм путём фильтрации в стерильную ёмкость необходимого объёма надсадочной жидкости или анализируемой воды. Фильтры с осевшей на их поверхности микрофлорой помещали в инкубационные контейнеры, куда вносили 3 – 6 мл фильтрата и 10 мл рабочего раствора метиленового синего, с исходной концентрацией реактива 20 мкг/мл. Объёмы до 6 мл можно не фильтровать. В нашем случае фильтрации были подвергнуты разведения обеих проб: пр. №1 – 10 и 2 мл, что соответствует навескам 5 и 1 г; пр. №2 – 20 и 2 мл, соответственно 10 и 1 г. Питательный бульон и раствор рабочего реактива готовили на морской воде. В качестве контейнеров использовали шприцы объёмом 20 см<sup>3</sup>, из которых после внесения всех ингредиентов удаляли воздух, и инкубировали в термостате при 25°C в течение обычно 24 ч. За это время происходит восстановление красителя, с одной стороны, за счёт имеющихся в среде химических восстановителей, а с другой – вследствие использования его в качестве конечного акцептора электронов в ходе биологического окисления. Продолжительность инкубации зависит от активности и численности бактерий. Она определяется в каждом случае по обесцвечиванию содержимого контейнера и последующего восстановления окраски метиленового синего в ходе его реокисления. При низкой активности дегидрогеназ суточной экспозиции может оказаться недостаточно. В этом случае измерения повторяли через сутки. Так, для пробы №1 достаточной оказалась суточная инкубация, тогда как во второй пробе измерения были выполнены через 48 ч. Несмотря на достаточно быстрое обесцвечивание за счёт физико-химических процессов, эффект реокисления удалось зафиксировать лишь на вторые сутки. Измерение осуществляли с помощью спекрофотометра СФ-26. Для этого содержимое инкубационных шприцов вносили в измерительные кюветы ёмкостью 3 мл. Площадь поверхности контакта с воздушной средой составляла 1 см<sup>2</sup>. Результаты регистрировали при длине волны 650 нм дискретно

с интервалом в 1 – 5 мин до стабилизации показаний. Обычно возрастание оптической плотности длится от 5 до 40 мин. Измерения повторяли трижды для получения усреднённых данных во всем объёме содержимого инкубационного контейнера ( $D_{cp}$ ). Учитывая показания оптической плотности исходного раствора метиленового синего  $D_{исх}$  (20 мкг/мл), в нашем случае равного 1.5 ед, данные пересчитывали на 1 г влажного грунта (или сухого) по формуле:

$$M_n = \frac{20 * 2 * D_{cp} * V_k}{1.5 * V_p} = \frac{26.7 * V_k * D_{cp}}{V_p}$$

$$M_{ок} = M_n - M_0$$

где  $M_n$  – масса, окрашенной (окисленной) формы метиленовой сини, в грамме исследуемого образца через  $n$  минут после внесения в измерительную кювету (мкг·г<sup>-1</sup>);  $V_k$  – полный объём, содержащийся в контейнере (мл);  $D_{cp}$  – среднее из трёх промеров, значение оптической плотности через  $n$  минут после внесения в измерительную кювету;  $V_p$  – объём разведения пробы, внесённой в контейнер (мл);  $M_{ок}$  – масса реокисленного индикатора за интервал времени  $n$  (мкг · г<sup>-1</sup>);  $M_0$  – начальная масса окрашенной (окисленной) метиленовой сини в грамме исследуемого образца в момент внесения пробы в измерительную кювету (мкг·г<sup>-1</sup>).

Кроме того, для каждой пробы ставились контрольные параллели, в которые вносились те же ингредиенты, но в одну из них помещали стерильный фильтр, а в другую вносили антибиотик (пенициллин) в конечной концентрации 13 тыс. МЕ /мл. Пенициллин вносили в контейнер после суточной инкубации, избегая попадания воздуха. Измерение проводили после дополнительной 2-часовой экспозиции.

Результаты можно представлять в виде массы метиленового синего, подвергшегося реокислению, а также в виде производных параметров, таких как соответствующие количества электронов, протонов, кислорода.

Для подтверждения причастности именно бактерий к проявлению реверсного эффекта были проведены эксперименты с искусственно приготовленными десятикратными разведениями смешанных музейных культур *Micrococcus lutea* ATCC 9341 и *Bacillus subtilis* var 6633. С этой целью в пробирке с 10 мл МПБ (1:10) диспергировали по одной петле каждой из культур. Это послужило исходным разведением, из которого было приготовле-

но ещё одно десятикратное. В инкубационные ёмкости вносили по 3 мл разведений и 10 мл рабочего раствора метиленового синего. После суточной экспозиции учитывали, как описано выше, результаты реокисления. В контроль вносились стерильные ингредиенты, т.е. 3 мл стерильного МПБ и 10 мл индикатора.

В пробе №2 с целью выявления возможного искажения результатов вследствие осаждения бактериальных клеток, была определена численность гетеротрофов до и после центрифугирования. Посев осуществляли глубинным методом на среде [1]. Выросшие колонии подсчитывали через 5 сут. Все среды стерилизовали в автоклаве.

**Результаты и обсуждение.** В исследуемых нами пробах изменения оптической плотности существенно различались (рис. 2).

Восстановительные условия в пробе №2 оказывали ингибирующее влияние на активность аэробной микрофлоры. Максимальный уровень реокисления наблюдался в пробах с навеской в 1 г (фильтрация 2 мл). Полученные для тех же проб значения в 5 г навесках пробы №2 (фильтрация 10 мл) и в 10 г навесках пробы №1 (фильтрация 20 мл) в пересчёте на 1 г донных отложений были в 4 – 9 раз ниже. В контрольных ёмкостях пробы №2, а также в ёмкости со стерильным фильтром первой пробы изменений оптической плотности не наблюдалось, в то же время в контроле с антибиотиком пробы №1 (2 мл) отмечается её некоторый рост, около 10 % от показателей в эксперименте. Таким образом, чем выше бактериальная концентрация, тем более низкая степень активности дегидрогеназ. Подобные различия отмечал Р. Бартон, предлагая учитывать данные того разведения, которое даёт максимальное значение [6]. Возможно, инкубирование разведений в питательной среде способствует их стабилизации, как по численности, так и по дегидрогеназной активности в соответствии с условиями и свойствами среды. Причём она является суммой активностей исходного бактериального комплекса и того прироста, который образовался за время эксперимента, т.е. активности генерированной биомассы.

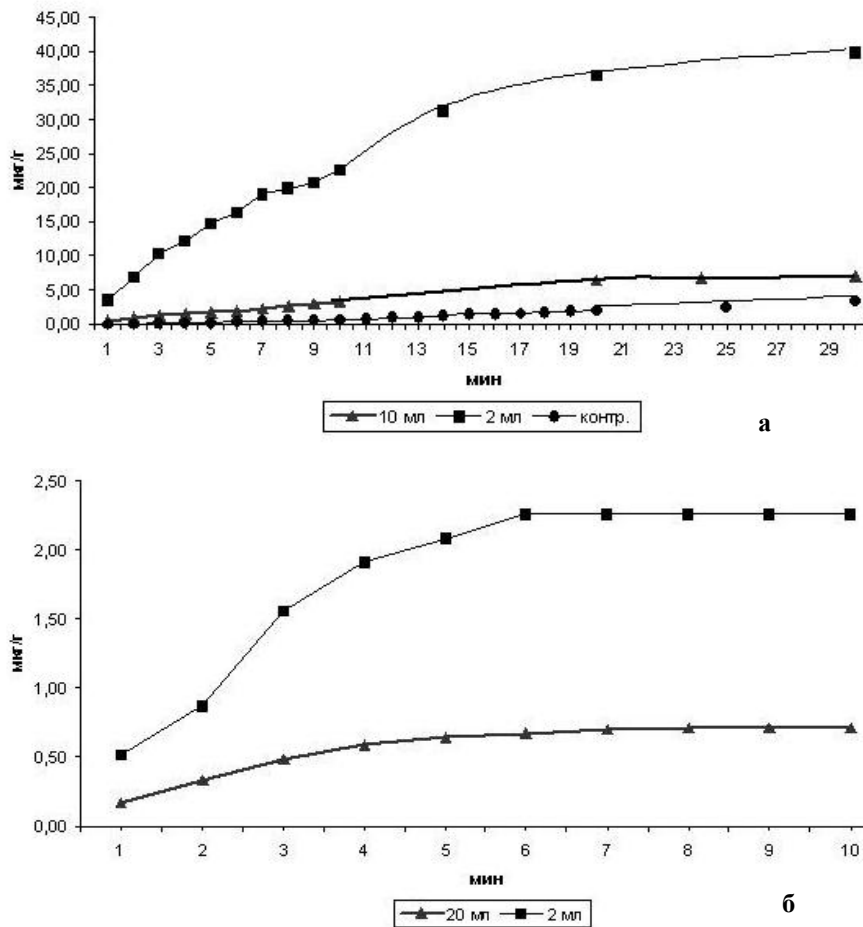


Рис. 2 Изменение в ходе реверсного окисления количества окрашенной формы метиленового синего, в пересчёте на грамм донного отложения: а) – проба №1; б) – проба №2. Фильтрация 2 мл разведения соответствует навеске в 1г, 10 мл – 5 г, 20 мл – 10 г.  
Fig. 2 Change of amount of the painted form methylene blue during of reverse oxidations in recalculation on gram of bottom sediment: а) – test №1; б) – test №2. The filtration of 2 ml dilution is corresponds of sediments weight 1g, 10 ml – 5 g, 20 ml – 10 g.

Благоприятные условия стимулируют размножение клеток, в результате чего различия между разведениями практически нивелируются. Применение митостатических препаратов, таких как митомицин С, подавляющих деление клеток, но не их физиологическую активность, возможно, позволит разделить эти

составляющие дегидрогеназной активности. Их соотношение может стать дополнительной характеристикой функционального состояния сообщества.

Данные 10-кратных разведений искусственной смеси культур *M. lutea* и *B. subtilis* также оказались близкими между собой, отличаясь не более чем в два раза (рис. 3).

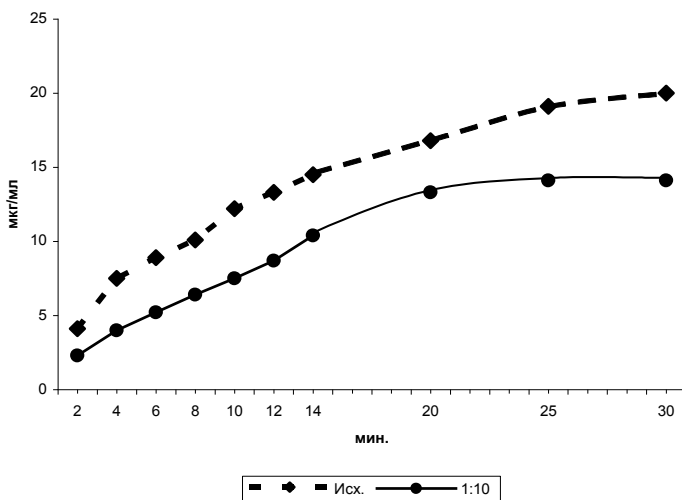


Рис. 3 Кинетика реокисления метиленового синего 10-кратными разведениями смешанных культур *Micrococcus lutea* и *Bacillus subtilis*  
Fig. 3 Kinetics of reoxidation of methylene blue by tenfold dilutions of mixing cultures *Micrococcus lutea* and *Bacillus subtilis*

В контрольном определении после суточной инкубации изменений оптической плотности в ходе измерения не отмечено. Её значение, равное 1.2, оставалось неизменным на протяжении 30 мин, и практически совпало со стартовым уровнем,

рассчитанным для содержимого контейнера после внесения всех ингредиентов (1.15). В экспериментальных же разведениях культур оптическая плотность изначально была ниже, но в ходе реокисления также достигла этой величины. Как правило, в природных пробах она редко выходит на уровень расчётных данных, так как некоторая часть индикатора на первом этапе (восстановлении) оказывается связанной в результате специфических физико-химических процессов, в частности, сорбции. В дальнейшем при контакте с кислородом воздуха в биохимическом реокислении уже будут задействованы лишь те молекулы реактива, которые способны будут «подключиться» к электрон-транспортной цепи. Таким образом, отсекается небиологическая потеря индикатора.

В исходных разведениях, подвергшихся центрифугированию, наблюдалось снижение численности гетеротрофных бактерий в 3 – 4 раза, с  $2.6 \cdot 10^4$  КОЕ/г до  $7.0 \cdot 10^3$  КОЕ/г соответственно. Это может приводить к некоторому занижению результатов.

Некоторый элемент неопределённости заключается также в процедуре измерения оптической плотности: при внесении в измерительную кювету содержимого инкубационных контейнеров. Процесс диффузии  $O_2$  определяется текущим состоянием метеофакторов, прежде всего, температурой и атмосферным давлением. Для химических реакций, протекающих в водной среде, диффузия реагентов имеет существенное значение. Биотический же компонент водных экосистем, часто функционирующий в микроаэрофильных средах, эволюционно выработал физиологические механизмы регуляции биохимических реакций, которые делают его более независимым от внешних условий. Можно сказать, что естественные колебания атмосферных факторов, и, в частности парциального давления кислорода, заложены в норму реакции бактериальных сообществ. Кроме того, определённая унификация достигается за счёт постоянства объёмно-поверхностных соотношений в измерительных кюветах.

Роль температуры в жизнедеятельности микроорганизмов общеизвестна. При экологических наблюдениях для определения фактической активности дегидрогеназ есть смысл производить измерения при температуре, соответствующей её значению в месте отбора пробы, а для выяснения максимального уровня активности – при температуре  $25^{\circ}C$ .

Метиленовая синь в отсутствие кислорода достаточно легко акцептирует водород от флавопротеидов. Учитывая, что окислительно-восстановительный потенциал метиленового синего, равный  $+0.011V$ , лежит в интервале потенциалов дыхательной цепи ( между  $-0.32V$  и  $+0.81V$ ), вполне возможно, что его восстановление идёт и в аэробных условиях. В этом случае он участвует как “внештатный” переносчик водорода, проходя ряд циклов восстановления-окисления. В гистохимических исследованиях описан метод использования МС в качестве промежуточного переносчика электронов на соли тетразолия [4]. Однако, пока имеется кислород, накопление восстановленной формы исключается. Таким образом, кислородное дыхание маскирует параллельное функционирование красителя в качестве переносчика восстановительных эквивалентов.

В анаэробных же условиях отсутствие естественного конечного акцептора приводит к блокировке и сокращению электрон-транспортной цепи, конечным пунктом которой становится МС [2]. Накопление восстановленной лейкоформы во внутриклеточном пространстве приводит к фотометрически регистрируемому обесцвечиванию инкубационной среды. При этом выпадает, как минимум, один участок сопряжённого синтеза АТФ. Несмотря на перманентный характер окислительного процесса, в эксперименте он протекает поэтапно, с достаточно продолжительной лаг-фазой. В это время происходит утилизация кислорода и далее, возможно, нитратов и нитритов в процессе денитрификации и нитратного дыхания. Контакт с кислородом при внесении в измерительные кюветы, активирует компоненты ЭТС.

Так, бактериальный цитохром *o*, служащий конечным акцептором электронов, способен к автоокислению молекулярным кислородом, что может инициировать запуск дыхательной цепи. Энергетически допустимо сбрасывание электронов на кофермент Q (+0.045В) с восстановленной МС, выступающей в роли промежуточного субстрата [3]. Кофермент является ключевым переносчиком электронов. Он рассматривается как “растворимый” переносчик, в отличие от “фиксированных”, таких как флavo-протеиды и цитохромы. Таким образом, через него возможно возобновление сброса восстановительных эквивалентов в заблокированную до этого цепь переносчиков. Наблюдающееся при этом возрастание оптической плотности соответствует скорости окисления в условиях нелимитированного наличия питательных веществ. Его интенсивность можно рассчитать для любого временного интервала. Процесс имеет типичный для замкнутых систем характер с выходом в стационарную фазу. Такой подход позволяет чётко контролировать продолжительность логарифмической фазы, которая редко превышает 30 мин. Д. Росс пришел к заключению, что изменение дегидрогеназной активности имеет линейный характер и соответствует таковой *in situ* только в течение 2 ч [11]. Г. Бартон также предлагал ограничивать инкубационный период минимумом [6].

В условиях анаэробноз лейкоформа МС, по всей видимости, блокируется со следующим переносчиком, возможно, тем же убихиноном (кофермент Q). Это подтверждается восстановлением окраски рабочего раствора индикатора при нагревании инкубационного контейнера до 90°C без доступа воздуха. Разрушение ферментного комплекса, очевидно, сопровождается переносом протонов водорода на кофермент с высвобождением окисленной формы метиленового синего. В дальнейшем, при термостатировании пастеризованного контейнера изменение окрашивания не наблюдалось, что указывает на подавление бактериальной жизнедеятельности. Повторное же инкуби-

рование проб, не подвергавшихся термической обработке, снова сопровождалось обесцвечиванием.

Описано участие в качестве побочных акцепторов электронов ряда ионов, в частности сульфатов и трёхвалентного железа [10]. В свою очередь, образующиеся при этом  $S^{2-}$  или  $Fe^{2+}$  способны восстанавливать соли тетразолия. Таким образом, при измерении прямой скорости восстановления индикаторных акцепторов, что имеет место в традиционных методах, искажение результатов возможно как при окислительных условиях среды, вследствие сброса по цепи переноса части электронов на сульфаты и железо, так и при восстановительных, когда накладывается процесс чисто химического восстановления. В первом случае, значения могут быть занижены, во втором же, наоборот, завышены, в зависимости от концентрации указанных веществ и, соответственно, масштабы протекающих процессов. При измерении реверсного эффекта цепь переноса электронов разбивается условно на два этапа. На первом этапе в восстановлении метиленовой сини в анаэробных условиях, как было указано выше, задействован лишь небольшой участок ЭТЦ. На этом этапе в обесцвечивание индикатора вносят свой вклад, в том числе, и отмеченные здесь побочные процессы. Возобновление доступности кислорода, как истинного терминального акцептора, стимулирует реокисление образовавшейся ранее лейкоформы индикатора через активацию второго участка цепи переноса, а регистрируемое при этом возрастание оптической плотности соответствует внутренней скорости функционирования ЭТЦ. Противоположная направленность второго этапа, т.е. не восстановление, а окисление красителя, позволяет исключить нежелательное наложение внешнего влияния. Однако остаётся открытым вопрос вовлечения в цепь переноса, наряду с восстановленными производными метиленового синего, других источников восстановительных эквивалентов.

**Выводы.** Основанный на эффекте биохимического реокисления метиленового синего

способ позволяет отслеживать дегидрогеназную активность бактериального сообщества в динамике, не завершая ход эксперимента в момент регистрации результата. Это, в свою очередь, даёт возможность выбора оптимального временного интервала, когда процесс приобретает линейный характер. Двухэтапность исследования, разделение процессов восстановления и окисления индикаторного реактива при регистрации результата, отсекает возможные искажения данных из-за наложения не биологиче-

ских физико-химических реакций. К достоинствам метода можно отнести также дешевизну и доступность как необходимых реактивов, так и оборудования для его проведения. Дальнейшие исследования, направленные на унификацию метеоусловий на стадии учёта восстановления окраски метиленового синего, т.е. его реокисления, будут способствовать более точному определению неспецифической дегидрогеназной активности бактерий в их естественных местах обитания.

1. Горбенко Ю. А. О наиболее благоприятном количестве «сухого питательного агара» в средах для культивирования морских гетеротрофных микроорганизмов // Микробиология. – 1961. – **30**, 1. – С. 168 – 172.
2. Готтшалк Г. Метаболизм бактерий. – М.: Мир, 1982. – 310 с.
3. Мецлер Д. Биохимия: в 3 т. / Мир. – М., 1980. – Т. 2: Химические реакции в живой клетке. – 606 с.
4. Пирс Э. Гистохимия. – М.: Изд-во иностр. литературы, 1962. – 962 с.
5. Чекалов В. П. Определение с помощью метиленового синего сорбционной способности и дегидрогеназной активности донных отложений // Экология моря. – 2006. – Вып. 72. – С. 103-109.
6. Burtton G. A., Lanza G. R. Variables affecting two electron transport system assays // Appl. Environ. Microbiol. – 1986. – **51**. – P. 931 – 937.
7. Gong P. Dehydrogenase activity in soil: a comparison between the TTC and INT assay under their optimum conditions // Soil Biol. Biochem. – 1997. – **29**. – P. 211 – 214.
8. Lenhard G. The dehydrogenase activity in soil as measure of the activity of soil microorganisms // Z. Pflanzenernaehr Dueng. Bodenked. – 1956. – **73**. – P. 1 – 11.
9. Mathew M., Obbard J. P. Optimization of the dehydrogenase assay for measurement of indigenous microbial activity in beach sediments contaminated with petroleum // Biotechnol. Lett. – 2001. – **23**. – P. 227 – 230.
10. Matson E. A. Community electron transport of prokaryotes in euryoxic estuarine sediment // Mar. Ecol. Prog. Ser. – 1987. – **41**. – P. 71 – 78.
11. Ross D. J. Some factors influencing the estimation of dehydrogenase activities of some soils under pasture // Soil Biol. Biochem. – 1971. – **3**. – P. 97 – 110.

Поступила 16 июня 2010 г.  
После доработки 20 декабря 2011 г.

**Ефект реверсного відновлення забарвлення метиленового синього та можливості його використання задля оцінки функціонального стану бактеріальних угруповань. В. П. Чекалов.** Для дослідження дегідрогеназної активності було запропоновано використовувати ефект зростання оптичної щільності метиленового синього при контакті проб, які зазнали попередню анаеробну експозицію, з киснем повітря. Розглянута можливість його пристосування для інтегральної оцінки функціональної активності мікробіальних популяцій.

**Ключові слова:** метиленовий синій, дегідрогеназна активність, бактеріобентос, Чорне море

**Effect of reverse restoration of methylene blue colouring and opportunity of its application for estimation of functional ability of bacterial community. V. P. Chekalov.** The effect of increase of optical density of methylene blue at contact of samples with oxygen of air after anaerobic expositions, was used by us for researches dehydrogenase activity. The opportunity of its application for an estimation of functional activity of microbial populations is considered.

**Key words:** methylene blue, dehydrogenase activity, bacteriobenthos, Black Sea