

0-734010-1

На правах рукописи
УДК 579.844.91.017.6/7



Зинурова Елена Евгеньевна

**СИНТЕЗ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ
БАКТЕРИЯМИ РОДА *CLOSTRIDIUM* И РОДА
*DESULFOVIBRIO***

03.00.07 – микробиология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Казань – 2003

Работа выполнена в Казанском государственном университете
на кафедре микробиологии

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Т.В. Багаева

Официальные оппоненты:

доктор ветеринарных наук, профессор Р.Г. Госманов;

кандидат биологических наук, вед.науч.сотр. М.Н. Давыдова

Ведущая организация:

Казанский государственный технологический университет

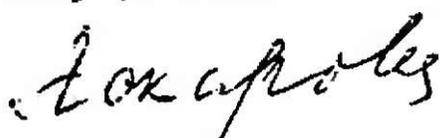
Защита диссертации состоится «24» апреля 2003 г.
в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 по
присуждению учёной степени доктора (кандидата) наук при
Казанском государственном университете

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке
Казанского государственного университета

Автореферат разослан «14» марта 2003 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук, доцент



Аскарлова А.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение способности анаэробных бактерий синтезировать углеводороды актуально, прежде всего, из-за энергичного потребления горючих ископаемых, с одной стороны, и возможного участия бактерий в процессах восстановления запасов углеводородов, с другой. Кроме того, повышение требований к охране окружающей среды ставит перед исследователями задачи по разработке эффективных и экологически безопасных способов получения энергоносителей.

Среди продуцентов жидких углеводородов наиболее перспективной считается зеленая водоросль *Botryococcus braunii* (Kitasato et.al., 1989; Metzger et.al., 1991; Жила и др., 2001; Byung-Woo, Sang-Jun, Jin-Young, 2001). Однако, большой интерес вызывают и анаэробные бактерии способные осуществлять важнейшие процессы трансформации веществ в анаэробных зонах биосферы (Розанова, Кузнецов, 1974; Gibson, 1990; Иванов и др., 1991; Заварзин, Колотилова, 2001). Из многообразия анаэробов наиболее вероятными продуцентами жидких углеводородов являются клостридии и сульфатредукторы, которые широко распространены в природе, обладают определенной устойчивостью к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, осуществляют различные процессы брожения, окисления органических веществ, гидролиза растительных остатков и другие реакции. Кроме того, бактерии указанных физиологических групп способны к биологической конверсии C-1 соединений, в частности, CO₂.

Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы являлось сравнительное определение способности бактерий рода *Clostridium* и рода *Desulfovibrio* к синтезу внеклеточных

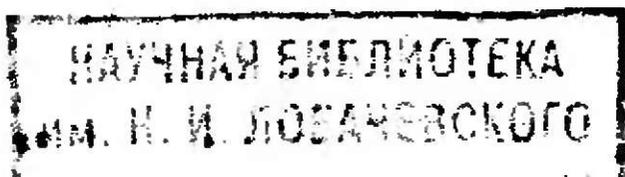
углеводородов, а также анализ зависимости продукции углеводородов от условий культивирования штаммов.

В соответствии с основной целью работы были определены следующие задачи:

- -изучить возможность бактерий рода *Clostridium* и рода *Desulfovibrio* синтезировать внеклеточные углеводороды и определить физиологическое состояние микробной популяции в период образования углеводородов,
- -определить период образования углеводородов бактериями,
- -установить зависимость образования углеводородов от условий культивирования штаммов,
- -определить состав внеклеточных и внутриклеточных углеводородов, образуемых бактериями,
- -выявить наиболее активных продуцентов внеклеточных углеводородов среди различных видов клостридий в сравнении с сульфатредукторами.

Научная новизна. Впервые показана способность бактерий рода *Clostridium* – коллекционных и природных штаммов - к синтезу внеклеточных углеводородов. Выявлен наиболее активный продуцент внеклеточных углеводородов штамм *Clostridium pasteurianum* ВКМ-1774.

Установлена зависимость синтеза углеводородов бактериями рода *Clostridium* и рода *Desulfovibrio* от стрессовых изменений в составе питательной среды. Показано, что максимальная продукция углеводородов характерна для физиологически активной культуры - синтез осуществляется в экспоненциальной и в начале стационарной фазы роста популяции, существенно опережая во времени период лизиса клеток.



Определены различия в характеристике спектров внутриклеточных и внеклеточных углеводов кластридий, а также в сравнении с углеводородами, образуемыми сульфатредукторами.

Показано усиление синтеза внеклеточных углеводов при введении H_2 и CO_2 в газовую фазу среды культивирования. Установлена зависимость синтеза внеклеточных углеводов от pH и Eh питательной среды.

Практическая значимость. Результаты проведенных исследований раскрывают новые аспекты жизнедеятельности анаэробных микроорганизмов. Они способствуют расширению сведений о физиологии и биохимии кластридий и сульфатредукторов и позволяют по-новому рассмотреть процесс участия бактерий в образовании углеводов в природе.

Полученные результаты являются теоретической основой для оценки и выбора наиболее перспективных штаммов, активно синтезирующих углеводороды, с целью создания биотехнологического процесса синтеза жидких углеводов с помощью анаэробных бактерий.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на отчетных научных конференциях КГУ (1999, 2001), на 8 международной конференции молодых ученых «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений» (Казань, 1996), на 8 Европейском конгрессе по биотехнологии (Будапешт, 1997), на международном конгрессе «Anaerobe-2000 (Манчестер, 2000), на международном конгрессе «ЕВЕС-2000» (Лондон, 2000), на международном конгрессе «Anaerobe Olympiad-2002» (Юта, 2002), на научном семинаре «Перспективы развития биотехнологий увеличения

нефтеотдачи пластов на поздней стадии разработки месторождений» (Альметьевск, 2002).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, экспериментальной части, заключения, выводов и списка литературы. Материалы изложены на 138 страницах, включая 14 таблиц и 15 рисунков. Список литературы содержит 50 отечественных и 151 иностранных наименований.

Основные защищаемые положения диссертации

1. Бактерий рода *Clostridium* и рода *Desulfovibrio* способны к синтезу внеклеточных углеводов; они продуцируют жирные кислоты и альдегиды, которые способны вступать в реакции конденсации с образованием углеводов, обладают высокой редуктазной активностью, способствующей осуществлению реакций восстановления веществ.

2. Внеклеточные углеводороды клостридий и сульфатредукторов синтезируются штаммами в процессе роста популяции и не являются продуктами разрушения клеток.

3. Синтез углеводов зависит от условий культивирования бактерий. Наиболее интенсивный процесс образования алканов наблюдается при изменении оптимальных условий роста бактерий в сторону стрессового воздействия. Для сульфатредукторов - это снижение в питательной среде сульфатов, для клостридий - удаление мела. Тем не менее, синтез углеводов возможен только при нормальном росте клеток. Наибольшее количество внеклеточных углеводов образуется, когда в питательной среде присутствуют органические соединения, обеспечивающие питательные потребности и рост бактерий, т.е. в гетеротрофных условиях. Кроме того, введение в

среду культивирования штаммов газовой смеси H_2+CO_2 , ускоряет и активизирует процесс образования алканов.

4. Синтезируемые бактериями внутриклеточные и внеклеточные углеводороды отличаются по своему составу. Внеклеточные углеводороды представлены, главным образом, алканами нормального и изостроения с длиной углеродной цепи $C_{11}-C_{24}$, внутриклеточные углеводороды состоят из высокомолекулярных алканов $C_{25}-C_{35}$

5. Синтез углеводородов и их количество зависит от физико-химических факторов среды, наиболее значимым из которых является окислительно-восстановительный потенциал. Повышение Eh способствует смещению реакций в сторону окислительных процессов, что снижает, а затем и прекращает образование углеводородов бактериями.

Материалы и методы исследований

Объекты исследований. В работе использовали 2 штамма бактерий рода *Clostridium* и 2 штамма бактерий рода *Desulfovibrio* и рода *Desulfotomaculum*, полученных из Российской коллекции микроорганизмов (г.Пушино) и штаммы клостридий выделенные из природных объектов.

Культивирование бактерий. Основные эксперименты, представленные в работе, были проведены на модифицированных средах Виноградского, где отсутствовал карбонат кальция и было снижено содержание глюкозы (10 г/л), а также на питательной среде Постгейта Д, где пируват был заменен на лактат (3,5 г/л), содержание сульфатов составляло 0,5 г/л. Газовая фаза – аргон или смесь $H_2+CO_2=90\%+10\%$.

Газовые смеси. Двуокись углерода и аргон использовали из баллонов. Молекулярный водород получали с помощью генератора

водорода типа СГС-2. Анализ концентрации и чистоты газов осуществляли на "Газохром-3101".

Определение роста бактерий. Рост кластридий регистрировали по увеличению спектра мутности на ФЭК-56. Рост сульфатредукторов определяли по приросту белка (Горина, Яковлева, 1980) и образованию сероводорода (Лурье, Рыбников, 1966; Widell, 1980).

Получение экстрактов клеток бактерий. При изучении внутриклеточных углеводов и определении активности СО-дегидрогеназы, клетки сульфатредукторов, либо кластридий центрифугировали, отмывали фосфатным буфером и разрушали с помощью ультразвукового диспергатора УЗДН-2Т. В опытах использовали супернатантную фракцию.

Определение углеводов. Углеводы из культуральной жидкости экстрагировали хлороформом в течение 24 часов после отделения клеток от ростовой среды центрифугированием и проверки супернатанта на отсутствие белка.

Анализ углеводов проводили газохроматографическим методом, используя «Chrom-5» (ЧССР). Продуктивность бактерий рассчитывали по количеству углеводов, синтезируемых на 1 мг белка.

Определение кислородсодержащих продуктов. Анализ кислот и спиртов проводили методом газожидкостной хроматографии на «Chrom-5» и методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol UV-25» (Чехия).

Определение активности СО-дегидрогеназы. Активность СО-дегидрогеназы определяли спектрометрически на «Specord-M40». За единицу активности фермента принимали восстановление

1 мкМ метилвиологена в 1 мин 1 мг белка (Andreesen, Ljundahl, 1974).

Аналитические методы. Количество глюкозы определяли в реакциях с калием железосинеродистым. Содержание альдегидов устанавливали по взаимодействию с реактивом Фелинга (Полюдек-Фабини, Бейрих, 1981).

Математическая обработка результатов исследований. Полученные экспериментальные данные обрабатывали согласно общепринятым методам (Плохинский, 1978).

Результаты исследований и их обсуждение

5.1. Способность к синтезу внеклеточных углеводов бактериями рода *Desulfovibrio* и рода *Clostridium*

В работе использовали бактерии наиболее широко распространенные в природе - штамм *D.desulfuricans* ВКМ 1799 и штамм *C.pasteurianum* ВКМ 1774.

5.1.1. Синтез углеводов бактериями рода *Desulfovibrio* и рода *Clostridium* на стандартных питательных средах

Первоначально синтез углеводов сульфатредукторов и клостридий исследовался на стандартных питательных средах. Среда Постгейта В для сульфатредуцирующих бактерий содержала лактат кальция, как основной окисляемый субстрат, дрожжевой экстракт и сульфаты (3,5 г/л) в качестве конечных акцепторов электронов. Среда Виноградского для клостридиальных бактерий, содержала в качестве органического субстрата – глюкозу. Для нейтрализации синтезируемых растущими клетками кислот в нее был внесен карбонат кальция (4 г/л). Газовая фаза – аргон или смесь H_2+CO_2 , в соотношении 2:1(об.) к питательной среде.

Исследования показали, что при культивировании *D.desulfuricans* ВКМ 1799 и *C.pasteurianum* ВКМ 1774 на

стандартных средах наблюдался активный рост штаммов (μ 0,14ч⁻¹). Параллельно увеличению биомассы в культуральной жидкости наблюдалось накопление кислородсодержащих продуктов (кислот и спиртов). Количество углеводов было незначительно и оставалось без изменений в процессе роста клеток.

Таким образом, как для бактерий рода *Desulfovibrio*, так и для бактерий рода *Clostridium* не зависимо от газовой фазы культивирования штаммов образование углеводов на стандартной среде культивирования бактерий находилось на уровне контроля.

5.1.2 Синтез углеводов бактериями рода *Desulfovibrio* и бактериями рода *Clostridium* на модифицированных питательных средах

Исходя из того, что на стандартных средах синтез углеводов у бактерий оставался незначительным, было решено их модифицировать.

В среде для *D.desulfuricans* ВКМ 1799 было решено провести снижение концентрации сульфатов, для частичного перераспределения потока H^+ от SO_4^{2-} к CO_2 . В среде для *C.pasteurianum* ВКМ 1774 удалили карбонат кальция, нейтрализующий кислоты, которые могут принимать участие в синтезе углеводов.

Исследования показали, что модификация сред незначительно снижала прирост биомассы как *D.desulfuricans* ВКМ 1799 (165-170 мг/л), так и *C.pasteurianum* ВКМ 1774 (200-212 мг/л). Однако количество экзометаболитов возрастало. Основными продуктами метаболизма штаммов, как и на стандартных средах, были кислородсодержащие соединения. Однако, на модифицированных средах, как у сульфатредукторов, так и у клостридий, в

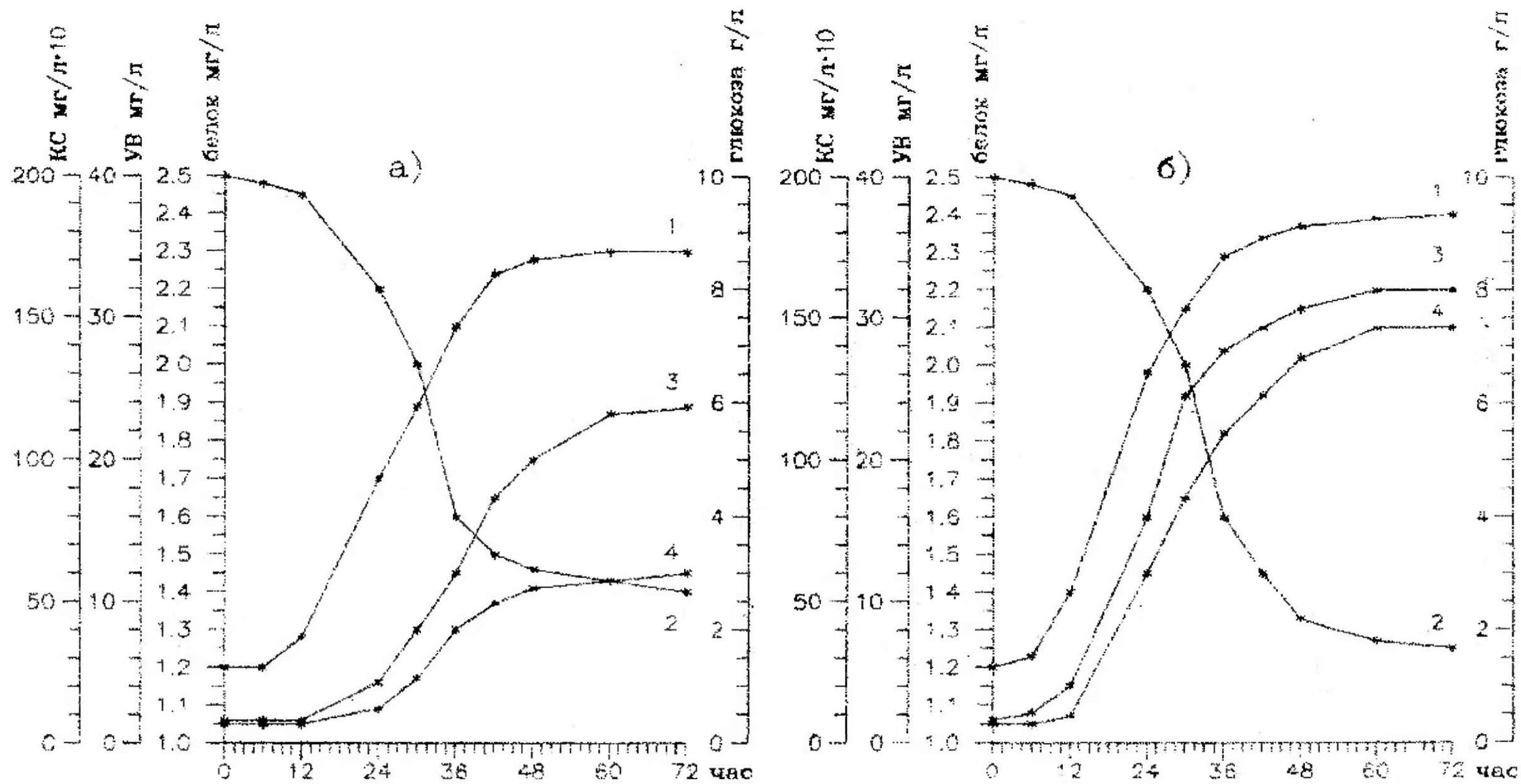


Рис. 1 Динамика роста *Clostridium pasteurianum* BKM - 1774 и образование продуктов метаболизма на модифицированной среде Виноградского без мела: а) в атмосфере аргона; б) в атмосфере H_2+CO_2 ; 1-биомасса, мг белка /л lg, 2-потребление глюкозы, г/л, 3-кислородсодержащие продукты, мг/л, 4-углеводороды, мг/л

культуральной жидкости были обнаружены углеводороды. Количество, которых у *D.desulfuricans* ВКМ 1799 составило $7,6 \pm 0,2$ мг/л в атмосфере аргона и $18,9 \pm 0,8$ мг/л в атмосфере газовой смеси, а у *C.pasteurianum* ВКМ 1774 соответственно $15,0 \pm 0,7$ мг/л и $29,6 \pm 0,9$ мг/л.

Поскольку образование углеводородов *C.pasteurianum* ВКМ 1774 было в 1,6 раз выше количества углеводородов, синтезируемых *D.desulfuricans* ВКМ 1799 на модифицированной среде в атмосфере газовой смеси, результаты данного эксперимента приведены на рис.1.

Существенно отметить, что увеличение внеклеточных углеводородов, как при росте сульфатредукторов, так и при росте клостридий, происходит параллельно с нарастанием биомассы, т.е. в период максимальной физиологической активности штаммов и не является следствием разрушения клеток.

5.2. Сравнительная характеристика спектров внутри- и внеклеточных углеводородов у бактерий рода *Desulfovibrio* и рода *Clostridium*

Все углеводороды, синтезируемые бактериями рода *Desulfovibrio* и рода *Clostridium*, представлены, в основном, нормальными алканами с длиной углеродной цепи $C_{11}-C_{35}$.

Внутриклеточные парафины имеют, в основном, высокомолекулярный состав $C_{25}-C_{35}$ (80-90%), как у сульфатредукторов, так и у клостридий. Внеклеточные углеводороды имеют длину углеродной цепи $C_{11}-C_{24}$. Основное отличие внеклеточных углеводородов *C. pasteurianum* ВКМ 1774 от внеклеточных углеводородов *D.desulfuricans* ВКМ 1799 связано с присутствием в их составе большего количества углеводородов с длиной цепи $C_{19}-C_{21}$ (у сульфатредуцирующих бактерий

Таблица 1

Характеристика спектров внутри и внеклеточных углеводов, выделенных из клеток *Desulfovibrio desulfuricans* ВКМ 1799 и культуральной жидкости, на период начала стационарной фазы роста

| Локализация | Газовая фаза | Количество углеводов, % отн. | | | | | | |
|----------------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|----------------------------|-------------------|------------------|----------------------|
| | | $\Sigma C_{11}-C_{18}$ | $\Sigma C_{19}-C_{24}$ | $\Sigma C_{25}-C_{35}$ | $\Sigma C_{CO_2}+H_2/Ca_r$ | $\Sigma C_{норм}$ | $\Sigma C_{изо}$ | $\Sigma C_{неч/чет}$ |
| Внутриклеточ. углеводороды | Аргон | 8,8±1,5 | 10,4±2,8 | 80,8±4,2 | | 82,0±3,4 | 18,0±3,0 | 1,08±0,08 |
| | H ₂ +CO ₂ | 8,5±2,4 | 18,7±2,0 | 72,8±3,0 | 1,5±0,5 | 84,0±1,5 | 16,0±3,0 | 1,10±0,01 |
| Внеклеточные углеводороды | Аргон | 45,3±3,0 | 40,9±2,6 | 13,8±2,4 | | 88,0±3,2 | 12,0±1,8 | 1,03±0,02 |
| | H ₂ +CO ₂ | 52,4±3,3 | 44,2±2,8 | 3,4±2,0 | 2,5±0,5 | 86,0±2,5 | 14,0±2,0 | 1,04±0,03 |

Таблица 2

Характеристика спектров внутри и внеклеточных углеводов, выделенных из клеток *Clostridium pasteurianum* ВКМ 1774 и культуральной жидкости, на период начала стационарной фазы роста

| Локализация | Газовая фаза | Количество углеводов, % отн. | | | | | | |
|----------------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|----------------------------|-------------------|------------------|----------------------|
| | | $\Sigma C_{11}-C_{18}$ | $\Sigma C_{19}-C_{24}$ | $\Sigma C_{25}-C_{35}$ | $\Sigma C_{CO_2}+H_2/Ca_r$ | $\Sigma C_{норм}$ | $\Sigma C_{изо}$ | $\Sigma C_{неч/чет}$ |
| Внутриклеточ. углеводороды | Аргон | 10,2±1,2 | 35,6±2,5 | 54,2±4,2 | | 89,3±3,5 | 10,5±3,2 | 1,00±0,02 |
| | H ₂ +CO ₂ | 14,0±2,8 | 36,2±2,0 | 49,8±4,5 | 1,2±0,5 | 81,6±2,5 | 18,4±2,8 | 1,02±0,02 |
| Внеклеточные углеводороды | Аргон | 59,2±3,8 | 34,6±4,8 | 6,2±0,5 | | 68,4±3,5 | 31,6±2,5 | 1,02±0,02 |
| | H ₂ +CO ₂ | 63,2±2,8 | 30,8±4,2 | 6,0±1,2 | 2,0±0,5 | 62,4±3,0 | 37,6±2,5 | 1,04±0,04 |

преобладают алканы $C_{16}-C_{18}$), а также увеличением (в 2,6 раз) в синтезируемых углеводородах количества изоформ. Коэффициент нечетности внутри и внеклеточных алканов, как у сульфатредукторов, так и у клостридий равен 1. Введение в среду культивирования штаммов газовой смеси H_2+CO_2 увеличивает в 2,5 раза синтез внеклеточных углеводородов у *D.desulfuricans* ВКМ 1799 и в 2,0 раза у *C.pasteurianum* ВКМ 1774 (табл.1-2). Синтез внеклеточных углеводородов увеличивается за счет большего образования низкомолекулярных алканов.

Данные сравнительного изучения внутри и внеклеточных углеводородов бактерий рода *Desulfovibrio* и рода *Clostridium* еще раз показали, что обнаруживаемые нами внеклеточные углеводороды не являются результатом лизиса клеток, так как углеводороды $C_{25}-C_{35}$, характерные для внутриклеточных алканов изучаемых бактерий, присутствуют в них в следовых количествах.

5.3. Изменения газовой фазы в процессе роста бактерий рода *Desulfovibrio* и рода *Clostridium*

Наблюдаемое увеличение синтеза внеклеточных углеводородов в зависимости от введения газовой смеси в среду культивирования сульфатредукторов и клостридий, позволило предположить участие водорода и углекислого газа в изучаемом процессе.

Было установлено, что концентрация газов уменьшалась по мере накопления внеклеточных продуктов метаболизма. Наиболее активно шло потребление углекислого газа у *D.desulfuricans* ВКМ 1799. К концу стационарной фазы роста штамма его концентрация составляла не более 0,3% от исходного объема. Потребление водорода у *D.desulfuricans* ВКМ 1799 проходило медленнее и не полностью. В случае культивирования *C.pasteurianum* ВКМ 1774

концентрация водорода в среде уменьшилась вдвое. Углекислый газ был использован не полностью. Вероятнее всего это связано с образованием газообразных продуктов брожения.

Таким образом, в процессе роста и образования углеводов, как у сульфатредукторов, так и у клостридий, происходит потребление водорода и углекислого газа.

5.4. Влияние физико-химических факторов на рост и образование углеводов бактериями рода *Desulfovibrio* и рода *Clostridium*

5.4.1. Влияние pH среды на рост штаммов и образование углеводов

Одним из факторов, влияющих на жизнедеятельность микроорганизмов, является pH питательной среды (Заварзин, Колотилова, 2001). Проведенные нами исследования показали, что *D.desulfuricans* ВКМ 1799 и *C.pasteurianum* ВКМ 1774 росли в широком интервале pH 5,5-9,0. Оптимальный рост *D.desulfuricans* ВКМ 1799 наблюдался при pH 7,0. В отличие от сульфатредукторов, *C.pasteurianum* ВКМ 1774, не имел четко выраженного максимума, однако наибольшее накопление биомассы наблюдалось при pH 7,0-7,4. Изменение начальных значений pH питательной среды в сторону от оптимальных показателей, влияя на рост штаммов, приводит к изменению накопления внеклеточных продуктов. Максимальное накопление углеводов в культуральной жидкости, также как и кислородсодержащих продуктов, наблюдается при росте *D.desulfuricans* ВКМ 1799 на среде с начальным значением pH 7,0 и для *C.pasteurianum* ВКМ 1774 pH 7,0-7,4, т.е. соответствует оптимальным значениям pH для роста штаммов.

Исследуемые нами начальные значения рН питательной среды не значительно влияют на характеристику внеклеточных углеводов, как у сульфатредукторов, так и у клостридий

5.4.2 Влияние окислительно-восстановительного потенциала среды на рост штаммов и образование углеводов

Окислительно-восстановительный потенциал среды - важный факторов, влияющий на рост и распространение, как сульфатредукторов, так и клостридий (Вайнштейн, Гоготова, 1987; Gottschalk, Andreesen, Hippe, 1992).

Как показали исследования *D.desulfuricans* ВКМ 1799 и *C.pasteurianum* ВКМ 1774 росли в широком диапазоне Eh от -100 до -400 мВ. Наиболее интенсивный прирост биомассы у *D.desulfuricans* ВКМ 1799 наблюдался при значении Eh среды (-290мВ), у *C.pasteurianum* ВКМ 1774 при Eh (-300)-(-350)мВ. Максимальное образование кислородсодержащих продуктов было отмечено при более высоких значениях Eh (-100 мВ). Наиболее интенсивный синтез углеводов (25-27мг/л) у *D.desulfuricans* ВКМ 1799 наблюдался в интервале Eh среды (-290)-(-360)мВ, у *C.pasteurianum* ВКМ 1774 (33-36 мг/л) при Eh среды (-300)-(-400) мВ. Изменение значений Eh среды выше (-200 мВ), приводило к достаточно резкому снижению синтеза углеводов, как у сульфатредукторов, так и у клостридий. Однако если у сульфатредукторов при Eh (-100 мВ) синтез углеводов полностью прекращался, то у клостридий при данном значении Eh незначительный синтез углеводов продолжается (рис.2-3).

Синтезируемые *D.desulfuricans* ВКМ 1799 и *C.pasteurianum* ВКМ 1774 углеводороды, по мере понижения окислительно-восстановительного потенциала среды характеризовались

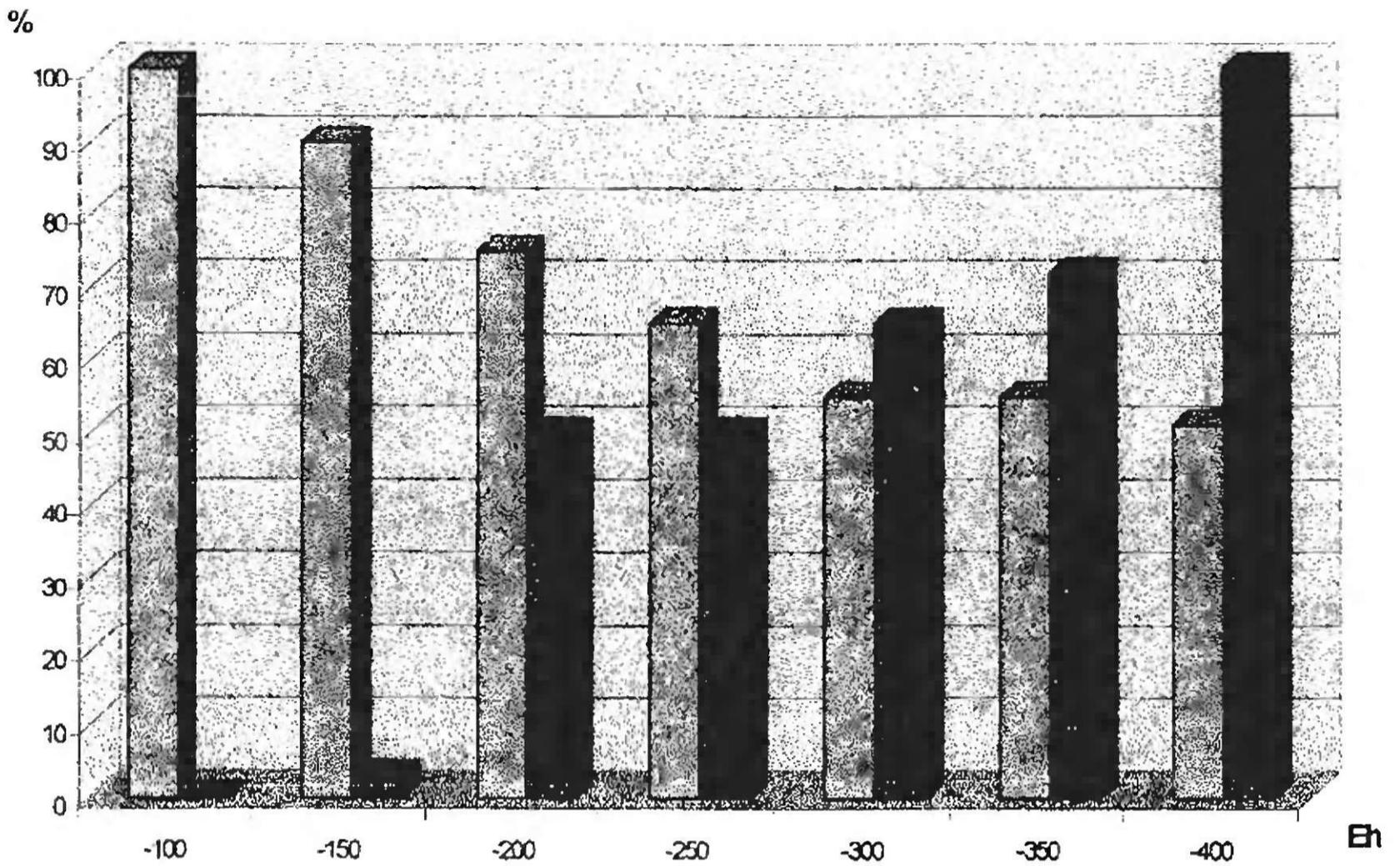


Рис. 2 Диаграмма продуктивности внеклеточных продуктов при культивировании *Desulfovibrio desulfuricans* BKM 1799 на среде с различными значениями Eh:
 ■ - кислородсодержащие ■ - углеводороды

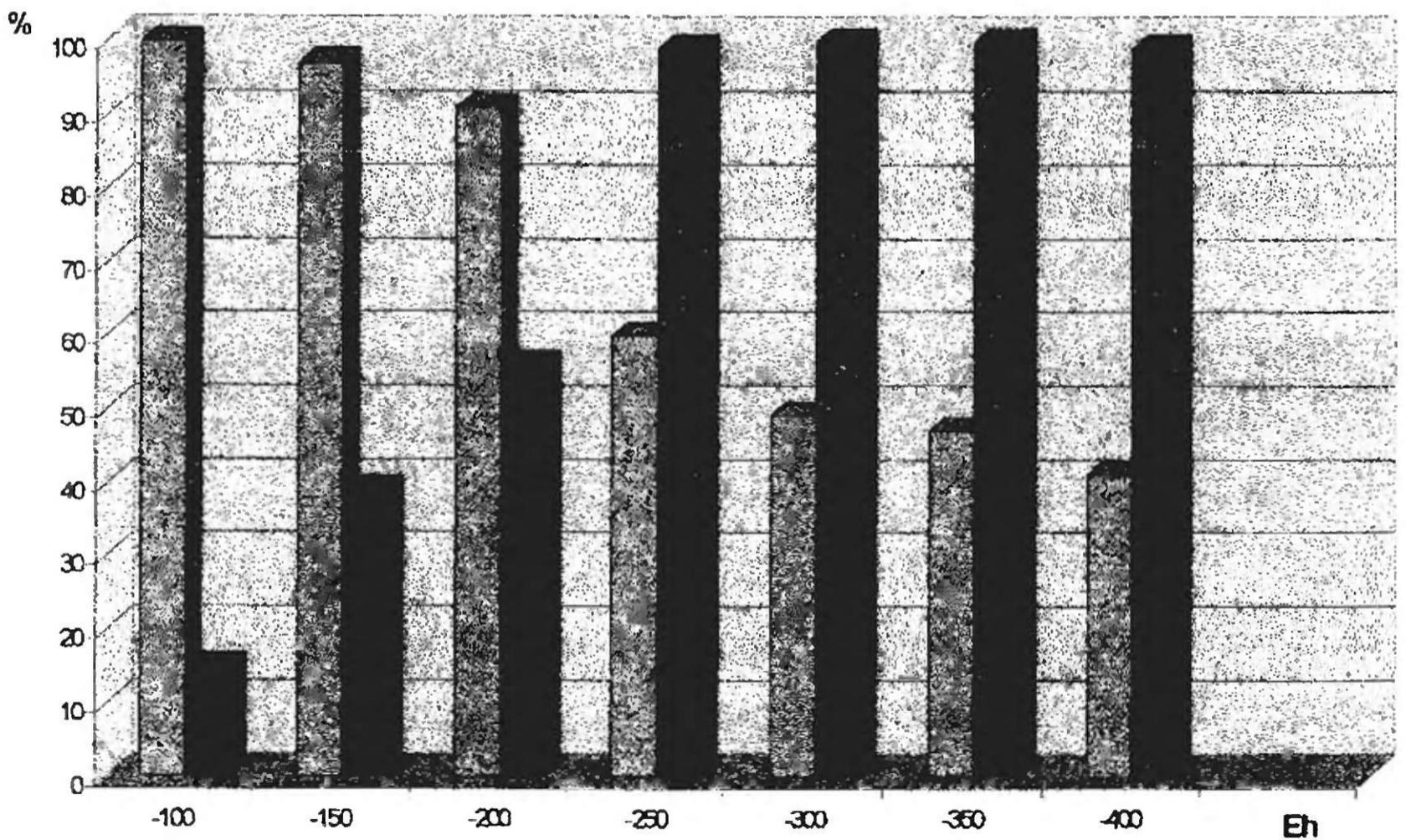


Рис. 3 Диаграмма изменений количества внеклеточных продуктов метаболизма *Clostridium pasterianum* BKM 1774 при росте с различными начальными значениями Eh:
 ■ - кислородсодержащие ■ - углеводороды

увеличением количества алканов с более короткой длиной цепи (C_{11} - C_{18}), а также небольшим увеличением количества изоформ.

Таким образом, наиболее благоприятными условиями для роста и синтеза углеводородов анаэробными бактериями являются показания Eh питательной среды ниже значений (-250 мВ).

5.5 Определение редуктазной активности у бактерий рода *Desulfovibrio* и рода *Clostridium*

Образование внеклеточных углеводородов анаэробными бактериями может быть связано с редуктазной активностью штаммов. Сравнительное определение СО-дегидрогеназной активности в клеточных экстрактах *D. desulfuricans* ВКМ 1799 и *C. pasteurianum* ВКМ 1774, выращенных на модифицированных средах в атмосфере газовой смеси H_2+CO_2 в конце экспоненциальной фазы роста, показало, что штаммы обладают достаточно высокой СО-дегидрогеназной активностью. В культуральной жидкости активность фермента не обнаружена.

5.6. Синтез углеводородов различными таксономическими группами анаэробных бактерий

Для сравнения способности сульфатредукторов и клостридий синтезировать внеклеточные углеводороды, необходимо было исследовать данный метаболизм и на других коллекционных и природных штаммах бактерий. С этой целью первоначально было проведено выделение и идентификация бактерий рода *Clostridium*.

5.6.1. Выделение бактерий рода *Clostridium* из природных объектов и идентификация их видового состава

В работе использовали образцы природных объектов (почва, навоз, рубец жвачных животных), где наиболее широко распространены бактерии рода *Clostridium* (Заварзин, 1979; Gottschalk, Andreesen, Hippe, 1992; Заварзин, Колотилова, 2001).

Выделение штаммов из природных объектов проводилось по общепринятой схеме. Полученные штаммы бактерии рода *Clostridium* были идентифицированы и использованы нами в дальнейших экспериментах.

5.6.2. Способность к синтезу внеклеточных углеводов представителей других таксономических групп анаэробных бактерий

В работе использовали коллекционные штаммы сульфатредуцирующих бактерий, принадлежащих к разным родам и видам, а также коллекционные и выделенные из природных источников клостридиальные формы бактерий.

Наибольшее количество биомассы продуцировал коллекционные штаммы *D. desulfuricans* ВКМ 1799 и *C. pasteurianum* ВКМ 1774 ($\mu=0,13 \text{ ч}^{-1}$). *Dtm.nigrificans* ВКМ 1492, имел невысокие значения по накоплению биомассы и удельную скорость роста, однако, это характерно для большинства представителей рода *Desulfotomaculum* (Peck, LeGall, 1987).

Все исследуемые нами бактерии, в том или ином количестве, синтезировали внеклеточные углеводороды (табл.3). Больше количество углеводов продуцировали штаммы *C.pasteurianum* ВКМ 1774, *D. desulfuricans* ВКМ 1799, *Dtm.nigrificans* ВКМ 1492, *C.butyricum* ВКМ 1782. Количество синтезируемых бактериями углеводов зависит от роста штамма, но эта зависимость не прямолинейна.

Несмотря на разнообразие видового состава изучаемых бактерий, спектры углеводов имеют определенное сходство. Все обнаруженные нами углеводороды располагаются в области C_{11} - C_{24} . Основное отличие спектров углеводов большинства клостридий от сульфатредукторов - образование большего

Показатели роста культур и синтеза внеклеточных углеводов, продуцируемых различными таксономическими группами анаэробных бактерий на период стационарной фазы роста штаммов

| | Вид микроорганизма | μ | Белок мг/л | Количество углеводов мг/л | Продуктивность мкг УВ/ мг белка | Углеводы % от биомассы |
|---|---|-------|-------------|---------------------------|---------------------------------|------------------------|
| 1 | <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ВКМ1799 | 0,13 | 170,5 ± 1,9 | 18,9 ± 0,8 | 0,11 | 11,9 ± 0,34 |
| 2 | <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> ВКМ1492 | 0,08 | 138,2 ± 1,6 | 14,9 ± 0,6 | 0,11 | 10,8 ± 0,31 |
| 3 | <i>Clostridium pasteurianum</i> ВКМ 1774 | 0,13 | 212,0 ± 2,7 | 29,6 ± 0,9 | 0,14 | 13,5 ± 0,35 |
| 4 | <i>Clostridium butyricum</i> ВКМ 1782 | 0,10 | 205,5 ± 2,5 | 14,0 ± 0,6 | 0,07 | 6,83 ± 0,40 |
| 5 | <i>Clostridium rubrum</i> | 0,06 | 125,0 ± 1,5 | 6,0 ± 0,05 | 0,05 | 4,80 ± 0,18 |
| 6 | <i>Clostridium sphenoides</i> | 0,06 | 150,0 ± 2,5 | 8,0 ± 0,05 | 0,05 | 5,33 ± 0,18 |
| 7 | <i>Clostridium acetobutylicum</i> | 0,06 | 120,0 ± 1,6 | 6,5 ± 0,05 | 0,05 | 5,42 ± 0,21 |
| 8 | <i>Clostridium butyricum</i> | 0,07 | 200,0 ± 2,6 | 13,0 ± 0,7 | 0,07 | 6,50 ± 0,36 |
| 9 | <i>Clostridium pasteurianum</i> | 0,11 | 200,0 ± 2,7 | 27,0 ± 0,9 | 0,14 | 13,50 ± 0,45 |

количества изоформ. Однако, и этот показатель характерен не для всех штаммов.

Таким образом, установлено, что различные таксономические группы клостридий и сульфатредукторов, способны к синтезу внеклеточных углеводов.

Механизм образования углеводов у микроорганизмов, связан с взаимодействием жирных кислот с альдегидами, как соединениями наиболее реакционно-способным в данном процессе.

Результаты экспериментов показали, что образование альдегидов характерно для всех штаммов бактерий. Альдегиды обнаруживались в среде в первые часы культивирования штаммов и присутствовали в ней до начала стационарной фазы роста. К концу стационарной фазы роста штаммов альдегиды в среде культивирования отсутствовали.

З а к л ю ч е н и е

Проведенные исследования показали, что бактерии рода *Clostridium* и рода *Desulfovibrio* способны к синтезу внеклеточных углеводов. Эта способность характерна, как для коллекционных штаммов, так и выделенных из природных объектов. Наиболее активным штаммом, синтезирующим внеклеточные углеводороды, является *C. pasteurianum* ВКМ-1774.

Первые исследования образования внеклеточных углеводов анаэробными бактериями были проведены на стандартных средах: Однако, несмотря на активный рост штаммов углеводороды в культуральной жидкости либо отсутствовали, либо имелись в незначительном количестве.

Увеличение количества синтезируемых углеводов было достигнуто модификацией питательных сред. У сульфатредукторов снижением концентрации сульфатов и перераспределением потока

электронов с SO_4^{2-} на CO_2 . У кластридий за счет удаления из среды карбоната кальция, нейтрализующего кислоты, участвующие в синтезе углеводородов. Можно предположить, что подобные изменения питательной среды вызвали стрессовое воздействие на бактерии. Тем не менее, синтезированные углеводороды не являлись продуктами лизиса клеток, так как накопление их в культуральной жидкости проходило по мере роста штаммов.

Способность кластридий и сульфатредукторов к образованию и накоплению внеклеточных углеводородов зависит от условий окружающей среды, и прежде всего от присутствия газовой смеси $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ в среде культивирования. Активное потребление газов сопровождается увеличением синтеза углеводородов в 2,5 раза у *D. desulfuricans* ВКМ 1799 и 2.0 раза у *C. pasteurianum* ВКМ-1774.

Значительное влияние на синтез углеводородов бактериями оказывают физико-химические факторы. Синтез парафинов происходит при низких значениях E_h питательной среды (-290)-(-360) мВ и оптимальных значениях рН. Это связано, по-видимому, с тем, что при более высоких значениях E_h в клетках наблюдается сдвиг биохимических реакций в сторону окислительных процессов.

Синтезируемые внеклеточные углеводороды являются, главным образом, алканами нормального строения с длиной цепи $\text{C}_{11} - \text{C}_{24}$. Разнообразие получаемых углеводородов позволяет предположить, что синтез углеводородов связан с процессом конденсации жирных кислот и других продуктов метаболизма бактерий. Согласно механизму, предложенному Альбро и Дитмером (Albro, Dittmer, 1970), жирные кислоты, а в нашем случае это - лактат, пируват, ацетат - у сульфатредукторов; бутират, ацетат, пируват и другие органические кислоты - у кластридий, в виде

производных взаимодействуют с альдегидами с образованием спиртов, а затем углеводов.

Участие альдегидов в образовании углеводов было прослежено косвенным путем. Так их присутствие в культуральной жидкости было определено в период накопления внеклеточных углеводов. В конце стационарной фазы роста, когда увеличение количества углеводов в культуральной жидкости не наблюдалось, отсутствовали и альдегиды.

Таким образом, можно сделать заключение, что синтез углеводов клостридиями и сульфатредукторами осуществляется при участии кислот и альдегидов, синтезируемых клетками.

Синтез внеклеточных углеводов, как у клостридий, так и у сульфатредукторов, по-видимому, связан в основном, со способностью клеток к формированию капсул на поверхности клеточной стенки, одной из функций которой является защита бактерий от высоких концентраций кислот, образующихся в процессе метаболизма штаммов. Тем не менее, широкое распространение клостридий и сульфатредукторов в природе, в нефтяных пластах, а также способность накопительных культур, выделенных из природных объектов, синтезировать внеклеточные углеводороды, позволяет предположить возможность участия этих микроорганизмов в образовании углеводов в природе.

ВЫВОДЫ

- 1 Природные и коллекционные штаммы бактерий рода *Clostridium* и рода *Desulfovibrio* способны к синтезу внеклеточных углеводов, который осуществляется клетками в процессе роста популяции. Наиболее активным штаммом, синтезирующим внеклеточные углеводороды, является *Clostridium pasteurianum* ВКМ-1774.

- 2 Максимальное накопление углеводов приходится на начало стационарной фазы роста бактерий.
- 3 Синтез внеклеточных углеводов бактерий рода *Clostridium* и рода *Desulfovibrio* осуществляется при оптимальных для роста штаммов показателях рН и низких значениях окислительно-восстановительного потенциала Eh (-300 мВ)-(-400мВ).
- 4 Стрессовые изменения питательной среды активизируют процесс синтеза углеводов у бактерий рода *Clostridium* и рода *Desulfovibrio* при росте популяции в гетеротрофных условиях.
- 5 Синтезируемые бактериями рода *Clostridium* и рода *Desulfovibrio* внеклеточные углеводороды представлены алканами нормального и изостроения с длиной углеродной цепи C₁₁-C₂₄, внутриклеточные – C₂₅-C₃₅. В отличие от внеклеточных углеводов, которые синтезируют сульфатредукторы, алканы, синтезируемые клостридиями, содержат больше изоформ.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации:

1. Зинурова Е.Е., Багаева Т.В. Влияние начальных значений рН питательной среды на рост и образование углеводов сульфатредуцирующими бактериями /Тез. докл. 8 Международной конференции молодых ученых «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений». -Казань, 1996.-С.141-142.
2. Багаева Т.В., Зинурова Е.Е. Зависимость образования углеводов от концентрации сульфатов питательной среды при росте *Desulfovibrio desulfuricans* // Деп. в ВИНТИ 22.01.97, №187-В97.-С.1-9.
3. Багаева Т.В., Зинурова Е.Е. Влияние рН среды на рост и образование углеводов *Desulfovibrio desulfuricans* //Деп. в ВИНТИ 20.02.97, №540-В97.-С.1-12.

4. Bagaeva T.V., Zinurova e.e. Formate role in hydrocarbons synthesis / Abstract 8th European Congress of Biotechnology, Budapest, 1997.- P.168.
5. Багаева Т.В., Зинурова Е.Е. Влияние фосфатов на рост и образование углеводородов сульфатредуцирующими бактериями /Деп.в ВИНТИ 03.12.97, №3546-В97.-С.1-9.
6. Bagaeva T.V., Zinurova E.E. Hydrocarbons synthesise by anaerobic microorganisms /Abstract Inter.Congress of Confederation of Anaerobe Soc., Manchester, 2000.-P 185.
7. Bagaeva T.V., Zinurova E.E., Bagaev E.I. Anaerobe bacteria-producing of hydrocarbons /Abstract EBEC, London, 2000.-P.175.
8. Zinurova E.E., Zinurov R.R., Bagaeva T.V. The removing of heavy metals compounds by sulfate reducing bacteria during the growth /Abstract 6th Biennial Congress of Anaerobe Soc. of Americas, Utah, 2002.-P.110.
9. Bagaeva T.V., Zinurova E.E. The studing of biological activites of enzymes participating in hydrocarbo synthesis / Abstract 6th Biennial Congress of Anaerobe Soc. of Americas, Utah, 2002.-P.107.
10. Багаева Т.В., Зинурова Е.Е. Способность бактерий рода *Clostridium* синтезировать внеклеточные углеводороды //Микробиология.-2003. В печати.
11. Багаева Т.В., Зинурова Е.Е., Зинуров Р.Р. Внутри и внеклеточные углеводороды *Clostridium pasteurianum* ВКМ 1774 // Биохимия.- 2003. В печати.

