

ЛИТОАВТОТРОФНЫЙ РОСТ ПРЕСНОВОДНЫХ НИТЧАТЫХ СЕРОБАКТЕРИЙ BEGGIATOА LEPTOMITIFORMIS ШТАММ Д-402

© 2000 г. М.Ю. Грабович, В.Ю. Патрицкая, Г.А. Дубинина, В.В. Чурикова

Воронежский государственный университет

Впервые показана способность пресноводных нитчатых бактерий *Beggiatoa leptomitiformis* штамм Д-402 к хемолитоавтотрофному росту в микроаэробных условиях. Прирост биомассы обратно пропорционален концентрации кислорода в среде культивирования. Обнаружена высокая активность ключевых ферментов пентозо-фосфатного цикла (рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы (RuBisCo) и фосфорibuлокиназы). Скорость фиксации CO₂ составила от 112 до 139 нмоль/мин/мг белка, что соответствует скорости роста 18 – 20,0 % от углерода белка в час в условиях опытов. Удельная скорость окисления тиосульфата в микроаэробных условиях (0,15 мг/л) в 2 – 3,5 раза выше по сравнению с литогетеротрофным ростом в аэробных условиях и составляет соответственно 1,7 – 2,9 мкмоль/мин/мг белка и 0,9 мкмоль/мин/мг белка. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что *Beggiatoa leptomitiformis* штамм Д-402 способны успешно перестраивать метаболизм в зависимости от изменений внешних условий среды и конкурировать за различные источники углерода и энергии в сероводородных биотопах.

Ключевые слова: бесцветные нитчатые серобактерии, *Beggiatoa leptomitiformis*, литоавтотрофия, RuBisCo, фосфорibuлокиназа.

Бесцветные серобактерии занимают в природе специфические экологические ниши, которые характеризуются совместным присутствием 2 компонентов H₂S и O₂. Существовая в пограничных областях между аэробной и анаэробной зонами, эти микроорганизмы играют важную роль в биогеохимическом цикле серы. Данные бактерии принимают участие в изменении и поддержании окислительно-восстановительного потенциала благодаря своей способности окислять сульфид до сульфата.

Бесцветные серобактерии, такие как *Leucothrix*, *Thiothrix*, *Beggiatoa* являются важным компонентом микробных ассоциаций очистных сооружений и способствуют освобождению вод от сульфидных ионов. В связи с развернутыми исследованиями сообществ гидротермальных вентов выявилась важная роль бесцветных серобактерий как хемолитоавтотрофных первичных продуцентов в данных экосистемах.

Ввиду массового развития бесцветных серобактерий в природе представляется важным выяснить их вклад в процессы круговорота углерода и серы. Для этого необходимо детальное изучение процессов серного и углеродного метаболизма у представителей этой группы бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактерии и среда культивирования. В работе использованы бактерии *Beggiatoa leptomitiformis* штамм Д-402, выделенные из пресноводных водоемов очистных сооружений города Дмитрова. Для выращивания микроорганизмов *Beggiatoa leptomitiformis* использовали среду следующего состава (г/л): NaNO₃ - 0,620; NaH₂PO₄ - 0,125; CaCl₂ · 2 H₂O - 0,030; Na₂SO₄ - 0,500; KCl - 0,125; MgCl₂ · 6 H₂O - 0,050; дистиллированная вода; pH среды 7,0. Перед посевом в среды вносили раствор микроэлементов и витаминов - 1,0 · 10⁻³ (г/л) [1]. После ее стерилизации вносили 50 % раствор тиосульфата (5 г/л) и NaHCO₃ (0,500 - 1,0 г/л).

Создание микроаэробных условий. Бактерии культивировали в бутылках емкостью 1 л с прокладками из полибутиловой резины и закручивающимися металлическими колпачками в 125 мл жидкой среды. Создавали газовую фазу с различным содержанием кислорода. Конечный объем среды составлял 125 мл. Спустя сутки определяли процентное содержание кислорода в газовой фазе на газовом хроматографе. Контрольные определения содержания и расхода кислорода в жидкой фазе проводили в опытах без внесения тиосульфата микрометодом Перфильева [2]. После этого вносили 1 мл свежепрокипя-

ченного 50% раствора тиосульфата до конечной концентрации 5 г/л и инокулят 1 мл на 100 мл среды. Все анализы проводил после 3-4 пассажей в каждом из вариантов сред. Содержание O_2 в газовой фазе при культивировании бактерий изменялось незначительно. В случае снижения концентрации O_2 в вариантах с исходным содержанием O_2 0,2 и 0,1 мг/л газа более, чем на 25-30%, в газовую смесь дополнительно вводили определенную аликвоту воздуха.

Получение клеточной суспензии и ферментных препаратов. Суспензию клеток получали путем центрифугирования культуры микроорганизмов при 5000 g, 4°C, в течение 30 минут. Клетки дважды отмывали 0,1 моль/л трис-НСI-буфером (рН = 7,5) и осаждали при тех же режимах центрифугирования в течение 20 минут.

Гомогенат получали в результате разрушения бактериальных клеток с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т при мощности 500 Вт и частоте 22 кГц в течение 2 минут на ледяной бане. Супернатант получали после центрифугирования гомогената при 9000 g и 4°C в течение 30 минут.

Определение ключевых ферментов цикла Кальвина. Активность рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилазы (RuBisCo) определяли на ферментных препаратах с использованием меченого ^{14}C - $NaHCO_3$ [3]. Мерой активности фермента является скорость включения ^{14}C в кислотоустойчивый продукт реакции.

Неспецифическую фиксацию CO_2 определяли в контроле при отсутствии рибулозо-1,5-бисфосфата (<2% от общего значения). Так как активный центр RuBisCo чувствителен к кислороду, клетки микроорганизмов и супернатант выдерживали в атмосфере аргона во избежание инактивации фермента.

Фосфорибулокиназу определяли по скорости накопления щелочегидролизующего фосфата рибулозо-1,5-дифосфата [3]. Опыт проводили в атмосфере аргона. Среда инкубирования содержала следующие компоненты (ммоль/л): 100 ммоль/л трис-НСI-буфер (рН=7,8); $MgCl_2$ – 5; DTT – 5; рибозо-5-фосфат Na – 10; АТР Na_2 – 5; ферментный препарат - 0,05 мл. Реакцию останавливали ТХУ. Щелочегидролизующий фосфор определяли в присутствии 3% раствора $(NH_4)_2MoO_4$ и 1% раствора аскорбиновой кислоты.

Определение карбангидразы. Об активности фермента судили по времени перехода окраски индикатора (бромтимоловый синий) из синей в желтую в процессе реакции, катализируемой данным ферментом [3]:



Активность фермента определяли в условных единицах Вильбура и Андерсена по формуле:

$$A = 10 \left(\frac{T_{\text{кипяч.}}}{T_{\text{свеж.}}} - 1 \right) \div \text{мг.белка};$$

где $T_{\text{кипяч.}}$ и $T_{\text{свеж.}}$ - это время перехода окраски в присутствии кипяченого и свежего экстрактов.

Определение интенсивности ассимиляции $NaHCO_3$ в растворе. Суспензию клеток помещали в сосуд Варбурга, где находился $NaH^{14}CO_3$ в конечной концентрации 5 ммоль/л. Инкубировали в течение 1-2 минут. Для определения радиоактивности на подложку наносили 0,1 мл. Радиоактивность определяли после подкисления 1N HCl непосредственно на мишени на радиометре УМФ-1500; пересчет в импульсы производили с помощью пересчетной установки ПП-16.

Определение биомассы. Биомассу бактерий определяли по количеству белка. Белок определяли методом Лоури [4]. Целые клетки предварительно подвергали щелочному гидролизу в 1 N NaOH в течение 10 минут при 90°C [5].

Определение тиосульфата. Тиосульфат определяли йодометрическим титрованием.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Условия хемолитоавтотрофного роста. Попытки культивирования бактерий клеток (*V. leptomitiformis*) на среде минерального состава в присутствии тиосульфата при свободном доступе O_2 воздуха или его содержании в среде не менее 1% от состава газовой смеси (O_2 в пределах 9 – 1 мг/л среды) не дали положительных результатов. Стабильный рост нитчатых серобактерий отмечался в микроаэробных условиях при концентрации O_2 0,5 мг/л и ниже (табл.1). Удельная скорость окисления тиосульфата в микроаэробных условиях (0,15 мг/л) в 2 – 3,5 раза выше по сравнению с литогетеротрофным ростом в аэробных условиях и составляет соответственно 1,7 – 2,9 мкмоль/мин/мг белка и 0,9 мкмоль/мин/мг белка (рис.1).

Автотрофная фиксация CO_2 и активность ключевых ферментов цикла Кальвина. Для определения скорости фиксации CO_2 в автотрофных условиях на минеральной среде с тиосульфатом был использован радиоактивный углерод $NaH^{14}CO_3$. При автотрофном росте определена высокая скорость фиксации меченого углерода бикарбоната, сопоставимая с величинами, известными для других хемолитоавтотрофов [6]. В различных опытах скорость фиксации меченого угле-

рода варьировала в пределах от 112 до 139 нмоль/мин/мг белка, что соответствует скорости роста 18 – 20,0 % от углерода белка в час в условиях опытов. В таблице 2 представлены результаты опытов по окислению тиосульфата и накоплению биомассы при росте на минеральной среде с тиосульфатом в микроаэробных условиях. Нами показано, что прирост С белка происходил практически полностью за счет фиксации CO_2 . За первые сутки прирост составил от 2 – 5 мг С/л в различных опытах. $\%^{14}\text{C}$, согласно расчетам белка варьировал от 95 до 103 %, т.е. бактерии росли как хемолитоавтотрофы. Расчеты величины молярного урожая по клеточному углероду и по сухому весу составили соответственно 1,5-2 мг С и 6-8 мг/л. на ммоль окисленного тиосульфата.

Активности ключевых ферментов цикла Кальвина - рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы (RuBisCo) и фосфорибулокиназы были определены в клеточных экстрактах бактерий, выращенных в микроаэробных условиях при литоавтотрофном росте. Результаты опытов приведены в табл.3. Достоверно высокая активность ключевых ферментов автотрофной фиксации CO_2 в цикле Кальвина - RuBisCo и фосфорибулокиназы была определена только в клетках, выросших в автотрофных условиях. При литогетеротрофном росте нам не удалось обнаружить активность данных ферментов. Внесение в реакционную смесь специфических ингибиторов, таких как п-хлормеркурийбензоата (ингибитор ферментов, содержащих SH-группы) и пиридоксальфосфата показало, что п-хлормеркурийбензоат снижает активность RuBisCo на 93 %. Активность фосфорибулокиназы регулируется в присутствии пиридоксальфосфата и падает на 76 % (табл.3).

Активность карбангидразы, участвующей в превращении бикарбонатного иона (HCO_3^-) в CO_2 , непосредственно взаимодействующего с RuBisCo, составила 23,8 у.е. по сравнению с 5,6 у.е. при литогетеротрофном росте.

ОБСУЖДЕНИЕ

Способность пресноводных представителей рода *Beggiatoa* к хемолитоавтотрофному росту ранее не была показана, хотя у двух штаммов были обнаружены очень низкие активности рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы и фосфорибулокиназы. Мы доказали способность исследуемых бактерий к хемолитоавтотрофному росту. Стабильный рост наблюдался у *Beggiatoa leptomitiformis* штамм Д-402 в микроаэробных условиях культивирования при концентрации O_2 0,5 мг/л и ниже, причем автотрофный прирост биомассы обратно пропорционален

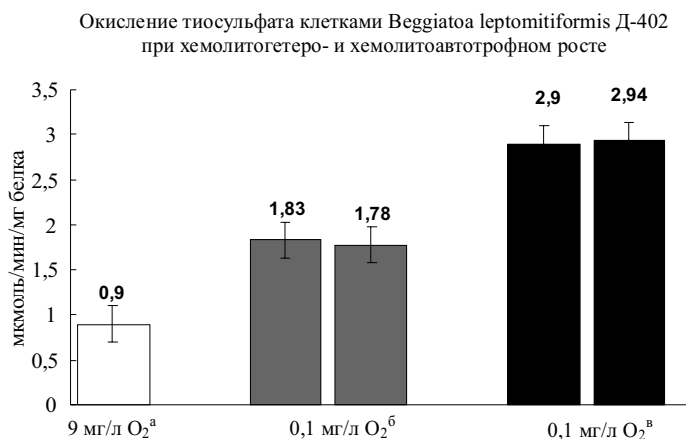


Рис. 1.

^a - Бактерии выращивали на среде, содержащей пептон - 0,2 г/л, сукцинат - 0,3 г/л, тиосульфат - 2 г/л;

^б - Бактерии выращивали на минеральной среде: 0,5 г/л NaHCO_3 , конечная концентрация тиосульфата - 5 г/л;

^в - то же, что и ^б, но 1,0 г/л NaHCO_3 .

концентрации O_2 в среде, и максимальный рост клеток наблюдался при 0,1 мг/л O_2 . Изучение процесса автотрофной фиксации клетками *Beggiatoa leptomitiformis* штамм Д-402, показало, что весь углерод клеточного белка бактерии получают из бикарбоната, предварительно переводя его в CO_2 , посредством работы карбангидразы, который и фиксируется в цикле Кальвина.

В микроаэробных условиях культивирования определены высокие активности ферментов цикла Кальвина: рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы и фосфорибулокиназы. Ингибиторный анализ показал, что активности данных ферментов регулируются специфическими ингибиторами. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что у пресноводного представителя рода *Beggiatoa* присутствует ключевые ферменты пентозофосфатного цикла. Их активность достаточна для обеспечения успешного протекания процесса ассимиляции CO_2 и коррелирует с таковой у типичных автотрофов. Энергию, необходимую для фиксации CO_2 микроорганизмы получают при окислении тиосульфата. Удельная скорость окисления тиосульфата при литоавтотрофном росте очень высока и прямо пропорциональна концентрации бикарбоната в среде культивирования: при увеличении концентрации NaHCO_3 с 0,5 до 1,0 г/л, интенсивность окисления тиосульфата возрастает в 1,6 раз. Эти данные говорят о сопряжении диссимиляционных процессов окисления серных соединений с фиксацией углекислоты в пентозо-фосфатном цикле.

Таким образом, особенности функционирования углеродного и серного метаболизма, необходимость в кислороде как в терминальном акцепторе электро-

нов определяют стратегию адаптации *Beggiatoa leptomitiformis* штамм Д-402 к условиям существования как градиентных микроорганизмов, обитающих в сероводородных биотопах. С другой стороны, способность быстро и успешно перестраивать метаболизм в зависимости от изменений внешних условий среды позволяет данным микроорганизмам успешно конкурировать за различные источники углерода и энергии.

Таблица 1. Прирост биомассы в хемолитоавтотрофных условиях в зависимости от концентрации кислорода в среде

| Возраст культуры, час. | Концентрация O ₂ , мг/л | | | |
|------------------------|------------------------------------|------|------|-------|
| | 1,0 | 0,5 | 0,2 | 0,1 |
| 24 | 1,0 | 1,5 | 1,25 | 7,5 |
| 48 | 1,0 | 3,0 | 8,25 | 11,25 |
| 72 | 1,0 | 4,5 | 10,5 | 15,25 |
| 96 | 1,0 | 3,25 | 1,5 | 3,25 |
| 120 | - | 1,5 | - | 1,5 |

Примечание:

Для опыта использовали пассированную в автотрофных условиях культуру (0,5 г/л NaHCO₃, тиосульфат 5 г/л). Вносили по 2 мл инокулята, из расчета 0,3 мг белка/л; Перед определением белка из клеток экстрагировали S⁰ (клетки помещали в этанол на 2 ч), проводили щелочной гидролиз и определяли методом Лоури.

Таблица 3. Удельная активность основных ферментов цикла Кальвина (нмоль/мин/мг белка) и карбангидразы (у.е.) *Beggiatoa leptomitiformis* при хемолитоавтотрофном росте в микроаэробных условиях культивирования

| Фермент | Условия опыта | | | | |
|-------------------|----------------|--|----|-------------------------------|----|
| | Без ингибитора | + пиридосяль фосфат (2,8•10 ⁻⁵ М) | %J | + ПХМБ (1•10 ⁻⁵ М) | %J |
| RuBisCo | 73,0 | - | - | 5,0 | 93 |
| Фосфорибулокиназа | 2138,0 | 503 | 76 | - | - |
| Карбангидраза | 23,8 | - | - | - | - |

ЛИТЕРАТУРА

1. Pfennig N. and Lippert K.D. // *Bedurfnis phototropher Schwefelbakterien*. Arch. Microbiol. 1966. V. 55. P. 245-256
2. Резников А. А. Методы анализа природных вод. М. 1970. С. 170-173.
3. Романова А. К. Биохимические методы изучения автотрофии у микроорганизмов. М. 1980. С. 42 - 115.
4. О. Н. Lowry, et al. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. № 1/2. P. 265-275.
5. Землянухин А. А. Практикум по биохимии. Воронеж. 1993. С. 16-21.
6. Kelly D.P. Microbial transformations and biogeochemical cyclin of one - carbon substrates containing sulfur, nitrogen or halogenes. *Microbial metabolism of C₁-compounds*. Intercept. Andover UK. 1993. P. 47-63.

Таблица 2. Скорость и молярный ростовой урожай для штамма *Beggiatoa leptomitiformis* Д-402 в микроаэробных условиях (0,15 мг/л O₂) при автотрофном росте. Длительность опыта 24 часа

| № опыта | S/S ₂ O ₃ ²⁻ , окисленного за время опыта, мг/л | Прирост белка, клеток, мг/л | C/NaH ¹⁴ CO ₃ в белке, % ^а | Молярный урожай сухого веса на ммоль окисленного тиосульфата | |
|---------|--|-----------------------------|---|--|---|
| | | | | мг С/ммоль окисленного тиосульфата ^б | мг сухого веса/ммоль окисленного тиосульфата ^в |
| 1 | 153,8 | 4,2 | 101 | 1,75 | 7,0 |
| 2 | 169,8 | 3,5 | 103 | 1,32 | 5,3 |
| 3 | 64 | 1,1 | 95 | 1,1 | 4,4 |

Примечание:

^а - % фиксированного С из NaH¹⁴CO₃ рассчитывали по формуле:

$$A(\%) = \frac{C_{\text{биом}} \cdot 100}{C_{\text{белка}}} = \frac{r \cdot C_{\text{карб}} \cdot 100}{R \cdot C_{\text{биом}}}$$

где r – радиоактивность образца, нанесенного на подложку, имп/мин/мл; R – общая радиоактивность образца, имп/мин/мл;

C_{биом.} – С/прироста биомассы, мг/л; C_{карб.} – количество карбонатов, мг.

^б – расчеты проводили, исходя из того, что мг С составляет ~ 50 % от клеточного белка;

^в - сухой вес определяли, исходя из следующего: мг сухого веса составляет ~ 50 % от мг С белка.