

УДК 631.46:576.095.3

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ИЗОТОПОВ УГЛЕРОДА АНАЭРОБНЫМИ БАКТЕРИЯМИ РОДА CLOSTRIDIUM

А. А. ИВЛЕВ, В. Т. ЕМЦЕВ, Л. К. НИЦЭ, С. А. ДЗЫСЮК, А. Г. КАЛОШИН,
Ю. Н. РАДЮКИН

(Кафедра микробиологии)

До настоящего времени вопрос о фракционировании изотопов углерода организмами с различным типом метаболизма в литературе специально не рассматривался. Имеются лишь отрывочные данные об изотопных эффектах в системе организм — среда, указывающие на их связь с метаболическими особенностями организма. Фотосинтезирующие организмы, в том числе растения и бактерии C_3 - и C_4 -типов, различающиеся по способам ассимиляции CO_2 и дыхания, существенно различаются также и по изотопному составу [6, 13, 15, 20]. Углерод биомассы первых более обогащен легким изотопом ^{12}C (от -25 до -30‰)¹, чем углерод биомассы вторых (от -9 до -19‰) и углерод CO_2 среды (от -7 до -10‰). У исследованных хемоавтотрофов так же, как и у C_3 -организмов, обнаружено существенное фракционирование изотопов углерода [1]. Имеются данные о том, что гетеротрофные организмы или вообще не фракционируют, или слабо фракционируют изотопы углерода, и поэтому углерод их биомассы близок по изотопному составу к углероду их пищи [10, 18, 19].

Среди исследователей пока нет единого мнения о том, какие именно особенности метаболизма организмов вызывают появление

изотопных эффектов. Одни считают, что они возникают при ассимиляции CO_2 [8, 14 и др.], другие связывают их с процессами диссимилиации органических соединений при дыхании [3]. Однако нет сомнения в том, что причины появления изотопных эффектов общие для большинства организмов независимо от их типа, и «узкие места», где происходит фракционирование изотопов, лежат на центральных метаболических путях [4].

В этой связи большой интерес представляет фракционирование изотопов углерода бактериями рода *Clostridium*, являющимися облигатными анаэробами. Механизм анаэробного получения энергии может быть различным. Одни виды бактерий черпают энергию при сбраживании простых и сложных углеводов, пуриновых и пиримидиновых оснований, аминокислот, выделяя в среду продукты их частичного окисления — масляную, уксусную и муравьиную кислоты, а также CO_2 и H_2 . Другие виды получают энергию за счет полного окисления ассимилируемых органических соединений, используя для этой цели кислород сульфатов и сульфитов². Допустив, что основное фракционирование изотопов углерода в клетке связано с процессами дыхательного метаболизма [3], можно ожидать иных изотопных эффектов (возможно, и по знаку)

¹ Изотопные концентрации определены относительно общепринятого стандарта РДВ в промиллях (0,1 ‰)

$$\delta^{13}C \text{ ‰ РДВ} = \left\{ \frac{[^{13}C/^{12}C] \text{ проба}}{[^{13}C/^{12}C] \text{ РДВ}} - 1 \right\} \cdot 10^3.$$

Стандарт РДВ представляет собой углерод карбоната кальция *Belemnite* *americana* из формации Пи-Ди (Южная Каролина, США). Отношение $^{13}C/^{12}C$ в нем равно $1123,72 \cdot 10^{-5}$.

² Геохимическая роль процессов сульфат-редукции определила тот факт, что именно эта сторона метаболизма бактерий рода *Clostridium* получила в литературе подробнейшее освещение. Детально исследованы изотопные эффекты серы (^{32}S — ^{34}S) в ассимилятивных и диссимилиативных процессах метаболизма (см., например, [11, 12]).

в системе организм — среда в первом случае по сравнению с последним.

В настоящей работе изучено изотопное фракционирование углерода у *Cl. pasteurianum* и у *Cl. acetobutylicum*, относящихся к бактериям сбраживающего типа.

Методика проведения эксперимента

Микроорганизмы были выделены из арктической орнитогенной почвы (о. Шпицберген) — штамм 024, из подзолистой почвы (Архангельск) — штаммы 012, 014, 015, аллювиально-болотной почвы (Египет, дельта Нила) — штаммы 044, 045, красной ферралитной почвы (о. Куба) — штамм 065. Указанные почвы значительно различались по содержанию питательных веществ, влажности, температуре, pH, Eh. Образцы их отбирали из верхнего горизонта 0—25 см.

Для получения накопительных культур использовали специфические питательные среды: TSP [5]; RCM [16]; VL [17]. После внесения в них инокулята накопительные культуры инкубировали в термостате при 27°. Чистая культура выделялась из накопительной с использованием питательной среды Емцева (МК-1) [2], соотношение ингредиентов в которой следующее: картофельный и морковный отвары — по 500 мл; глюкоза — 2,0 %, K_2HPO_4 — 0,1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,05 %; NaCl, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ и $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — следы; пептон — 0,5 %; дрожжевой автолизат — 0,02 мл/л.

Посев производили на чашки Петри с картофельно-морковным агаром. Чашки инкубировали в анаэробном (остаточное давление $1,33 \cdot 10^{-1}$ гПа) в течение 7 сут и 27°. Затем культуры пересевали в пробирки со средой Емцева и инкубировали в течение 5 сут при той же температуре. Идентификацию чистых культур и определение степени чистоты проводили с использованием специальных сред по способности микроорганизмов к росту и размножению, а также по физиологическим и морфологическим признакам [7]. Все штаммы, за исключением 024 из арктической орнитогенной почвы, были отнесены к виду *Cl. pasteurianum*, а штамм 024 — к виду *Cl. acetobutylicum*.

Одновременно методом газожидкостной хроматографии анализировали муравьиную, уксусную, пропионовую и масляную кислоты, выделяемые при брожении (табл. 1). Для этого производилось метилирование

Т а б л и ц а 1

Содержание кислот в продуктах брожения *Clostridium*

Штамм	Муравьиная	Уксусная	Пропионовая	Масляная
024	15,53	25,88	—	1,14
012	1,54	10,49	Следы	10,89
014	1,75	10,63	»	42,82
015	2,16	8,32	—	33,82
044	0,81	5,24	—	36,37
045	5,82	22,89	—	56,00
065	2,11	25,08	—	47,74

упаренного раствора культуральной жидкости, а затем образовавшиеся эфиры перечисленных кислот разделялись на хроматографической колонке высотой 1 м, диаметром 3 мм, заполненной целитом с нанесенной на него фазой полиэтиленгликоля. Детектирование проводили с помощью ионизационного пламенного детектора.

После накопления количества биомассы, достаточного для изучения изотопного состава углерода (~ 20 —30 мг в пересчете на сухую массу с учетом повторных определений), она подвергалась сушке на роторном испарителе.

Перевод углерода биомассы в CO_2 для последующего изотопного анализа осуществляли на разработанной во Всесоюзном научно-исследовательском геологоразведочном нефтяном институте универсальной установке, обеспечивающей полный перевод углерода образца в CO_2 путем твердофазного окисления, очистку CO_2 от сопутствующих продуктов окисления и заполнение предварительно отвакуумированной ампулы CO_2 .

Окисление проводили с помощью SiO при 700° в трубчатой кварцевой печи, в которую посредством специального устройства ввода помещалась лодочка с образцом. Окисление происходило в токе гелия, непрерывно продуваемого через печь и выносаемого продукты окисления в хроматограф. В хроматографической колонке высотой 1 м, диаметром 3 мм, заполненной пропаном Q, происходило деление продуктов окисления (CO_2 , N_2 , SO_2 и H_2O) и их детектирование на выходе с помощью катарометра. Одновременно контролировалась полнота сгорания и определялось количество образовавшейся CO_2 . Очищенная от примесей CO_2 с помощью жидкого азота улавливалась в V-образной стеклянной ловушке высоковакуумной установки, сочлененной посредством системы многоходовых кранов с хроматографом. При помощи кранов ловушка отсекалась от потока газа-носителя, и тем самым обеспечивалась автономная работа вакуумной установки. Поток газа-носителя с примесями выбрасывался в атмосферу. Форвакуумный и диффузионный насосы вакуумной части откачивали газ-носитель из ловушки до остаточного давления $1,33 \cdot 10^{-5}$ гПа, после этого CO_2 перемораживалась в ампуле в условиях вакуума и ампула отпаивалась.

Измерения изотопного состава углерода производились на отечественном масс-спектрометре МИ-1201. Точность воспроизведения результатов 0,5 %.

Аналогичным образом проводились подготовка образцов и изотопный анализ углерода ингредиентов описанной выше питательной среды Емцева.

Результаты и их обсуждение

Если предположить, что основное фракционирование изотопов в системе клетка — среда происходит в процессах диссимиляции [3], то изотопные эффекты должны определяться тем, какие соединения клетка выбрасывает в среду. Было показано, что в аэробных организмах в среду выделяется

Изотопный состав углерода биомассы бактерий рода *Clostridium* m. выделенных из различных типов почв и выращенных на питательной среде МК-1

Тип почвы	Содержание гумуса, %	Штамм	$\delta^{13}C$ ‰
<i>Cl. acetobutylicum</i>			
Арктическая орнитогенная	3,41	024	-19,4
<i>Cl. pasteurianum</i>			
Подзолистая	2,27	012	-22,8
		014	-20,6
		015	-20,3
Аллювиально-болотная	1,48	044	-22,4
		045	-22,1
Красная ферраллитная	3,81	065	-20,1

Примечание. $\delta^{13}C$ углерода компонентов среды (‰): картофельного и морковного отваров —22,1 и —23,1, глюкозы —9,7, пептона —22,09, дрожжевого автолизата —22,5

главным образом CO_2 , обогащенная тяжелым углеродом ^{13}C . Соответственно биомасса обогащена легким изотопом ^{12}C .

Анаэробы выбрасывают в среду частично окисленные продукты брожения — спирты и кислоты, синтез которых происходит в основном из C_2 - и C_1 -фрагментов, образующихся при деструкции пирувата в ходе гликолиза. У исследованных анаэробных бактерий рода *Clostridium*, как показывают данные табл. 1, основными продуктами брожения являются масляная, уксусная и муравьиная кислоты. Поскольку C_2 - и C_1 -фрагменты обогащены ^{12}C , то и в продуктах брожения также должно содержаться много ^{12}C . Отсюда ясно, что биомасса бактерий, напротив, должна быть обогащена ^{13}C .

Питательная среда МК-1, на которой выращивались бактерии, сложная по составу. Основными ее компонентами, как показано выше, являются картофельный и морковный отвары — смеси преимущественно углеводной природы. Углерод биомассы бактерий богат тяжелым изотопом, чем углерод компонентом среды, однако однозначного вывода на основе полученных экспериментальных данных сделать пока нельзя, так как в питательную среду входит также глюкоза, обладающая заметно более тяжелым изотопным составом. Поскольку биомасса бактерий по изотопному составу близка к углероду картофельно-морковного отвара, можно предположить, что глюкоза играет роль затравки.

Значения изотопных эффектов в системе

организм — среда, как видно из табл. 2, составляют от 2 до 4 ‰. Если учесть, что точность масс-спектрометрического изотопного анализа составляла $\pm 0,5$ ‰ при 95 % доверительной вероятности, значимость эффектов можно считать достоверной. Такой порядок значений эффектов свойствен фракционированию в гетеротрофах (как в аэробных, так и анаэробных) и, по-видимому, обусловлен однократными кинетическими изотопными эффектами реакции декарбоксилирования пирувата [9].

Углерод биомассы всех исследованных штаммов бактерий вида *Cl. pasteurianum* оказался изотопно легче углерода биомассы вида *Cl. acetobutylicum*. Несколько меньше, но также вполне значимы внутривидовые различия для штаммов *Cl. pasteurianum*, выделенных в разных почвенно-экологических условиях.

Разумеется, малые различия в изотопном составе углерода биомассы бактерий рода *Clostridium* и недостаточное количество экспериментальных данных не позволяют сделать окончательный вывод о существовании межвидовых и внутривидовых изотопных различий. Предстоит выяснить, от каких факторов они зависят. Возможность появления таких различий не является неожиданной, так как активность ферментных систем, влияющих на интенсивность метаболических реакций, в том числе реакции декарбоксилирования пирувата, от которых зависят изотопные эффекты в клетках, у штаммов может быть неодинаковой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондарь В. А., Гоголова Г. И., Зякун А. М. О фракционировании изотопов углерода фотоавтотрофными организмами с различными путями ассимиляции CO_2 . — Докл. АН СССР, 1976, т. 228, с. 1203—1207. — 2. Емцев В. Т. Некоторые вопросы морфологии и физиологии азотфиксирующих *Clostridium*. М.: Изд-во НИИ земледелия центр. р-нов Нечернозем-

ной полосы, 1959. — 3. А. А. Ивлев. Вопросы теории фракционирования изотопов углерода в фотосинтезирующих организмах. — Успехи современной биологии, 1976, вып. 81, с. 81—104. — 4. Ивлев А. А. Изотопный состав углерода в карбонатах и органическом веществе в истории Земли и этапы биологической эволюции. — Журнал эволюционной биохимии и физиологии,

- 1980, № 5.—5. Anema P. J., Kooiman W. J., Geers J. M.—J. Appl. Microbiol., 1973, vol. 36, N 4, p. 683—687.—6. Bender M., Roukham J., Veines H., Black C.—Plant. Physiol., 1973, vol. 52, p. 427—479.—7. Bergey D.—Manual of determinative bacteriology. Baltimore, 1957.—8. Degens E., Behrendt M., Gottharat B., Repmann E.—Deep. Sea. Res., 1968, vol. 15, p. 11—16.—9. Deniro M. J., Epstein S.—Sci., 1977, vol. 197, N 4300, p. 261—263.—10. Jones R. J., Zudlow M. M., Troughton J. H., Bbant C. G.—J. Agric. Sci., 1979, vol. 92 (1), p. 91—100.—11. Laishley E. J., Crouse H. R.—Can. J. Microbiol. 1978, vol. 24, p. 716—724.—12. McCready R. J. L., Laishley E. J., Crouse H. R.—Can. J. Microb., 1975, vol. 21, p. 235—244.—13. Osmond C. B., Ziegler H., Stichler W., Trimborn P.—Oecologia, 1975, vol. 18, p. 209—216.—14. Park R., Epstein S.—Geochim. et. Cosmochim. Acta, 2960, vol. 21, p. 110—116.—15. Quandt L., Jottschalk G., Ziegler H. Stichler W.—FCMS Microbiol. Zett, 1977, vol. 1, p. 125—128.—16. Sebald M., Tacquet A., Bricont F. Techniquet en bacteriologie. Paris, 1973.—17. Takeda K., Furusaka Ch.—Soil. Sci. Pl. Nutr., 1975, vol. 21, N 2, p. 113—118.—18. Thayer J. W., Parker P. L., Zacroix M. W.—B. Fry. Oecologia. Berl., 1978, vol. 35, p. 1—12.—19. Tiesen L. J.—Nature, 1978, vol. 276, p. 97—98.—20. Whelan T., Sackett W. M., Benedict C. R.—Biochem. Biophys. Res. Comm., 1976, vol. 41, p. 1205—1210.

Статья поступила 17 марта 1980 г.

SUMMARY

Fractionation of carbon isotopes by bacteria of *Clostridium* genus was investigated. The values of isotopic effects in the "organism—environment" system make 2—4%. The carbon isotope of the biomass of all the investigated strains of bacteria of *Clostridium pasteurianum* species proved to be lighter than the carbon isotope of the biomass of *Clostridium acetobutylicum* species. Intraspecific variations in the strains of *Cl. pasteurianum* isolated in different soils and ecological conditions are also quite significant, though not so great.