

УДК 579:57.017.73

ВЛИЯНИЕ ФОРМИАТА НА АССИМИЛЯЦИЮ УГЛЕРОДА МЕТАНОТРОФОМ METHYLOCOCCUS CAPSULATUS

Е. Г. ДАВИДОВА, А. Г. ЖИВОТЧЕНКО, Е. Р. ДАВИДОВ

(Кафедра применения изотопов и радиации в сельском хозяйстве)

Методом радиоактивных индикаторов исследована динамика ассимиляции субстратов: метана и формиата. Показано, что *M. capsulatus* может использовать формиат в основном как источник энергии, если его концентрация в среде не превышает критического уровня, после которого формиат начинает ингибировать ассимиляцию метана. Константа неконкурентного ингибирования формиатом ассимиляции углерода метана составляет 19 мМ. При ингибирующих концентрациях формиата выделение экстрацеллюлярных продуктов метаболизма метана существенно увеличивается.

Формиат является промежуточным продуктом окисления метана метанотрофами. Большинство из них способно использовать формиат в качестве дополнительного источника углерода и энергии [2—5]. Формиат может оказывать положительное действие на метанооксиляющие бактерии, которое выражается в увеличении удельной скорости роста и выхода биомассы [4]. Однако действие формиата в значительной степени зависит от его концентрации в питательной среде. В работе [3] указывается, что формиат в концентрациях до 10 мМ не влияет на рост метанотрофа, а при концентрации 50 мМ полностью ингибирует его. Некоторые авторы отмечают стимулирующее действие кислотосодержащих C—1-соединений на рост бактерий, ассимилирующих метан [4, 5]. Таким образом, сведения об ассимиляции формиата и его влияния на потребление метана метанотрофами довольно противоречивы. В связи с этим нами изучалась динамика ассимиляции углерода метана и формиата облигат-

ным метанотрофом *Methylococcus capsulatus* с применением метода радиоактивных индикаторов.

Методика

При проведении исследований использовали метанотроф *Methylococcus capsulatus*, полученный из музейной коллекции культур ВНИИсинтезбелок. Выращивали культуру в статических условиях на питательной среде следующего состава (г/л): NH_4Cl — 0,76; K_2HPO_4 — 0,68; K_2HPO_4 — 0,87; CaCl_2 — $3,63 \cdot 10^{-3}$; MgSO_4 — 70×10^{-3} ; ZnSO_4 — $0,43 \cdot 10^{-3}$; MnSO_4 — $0,88 \cdot 10^{-3}$; CuSO_4 — $0,78 \cdot 10^{-3}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — $0,25 \cdot 10^{-3}$; $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — $4,97 \cdot 10^{-3}$.

Исходная величина pH среды — 6,8, температура — 42 °С. Культивирование осуществляли в герметически закрытых конических колбах объемом 850 мл. Объем питательной среды — 100 мл. Время культивирования — 36 ч. Газовую смесь составляли, как описано в работе [1]. Полученную биомассу исполь-

зовали для исследования кинетики потребления субстратов — метана и формиата, меченных ^{14}C . Для этой цели бактерии отделяли от культуральной жидкости центрифугированием, ресуспендировали в свежую питательную среду и инкубировали в течение 15 мин, затем переносили в герметически закрытые сосуды объемом 150 мл, заполненные газовой средой. В сосуды вводили углеродные субстраты, составляя из них перекрестно меченые варианты (^{14}C -метан+формиат или метан+ ^{14}C -формиат), и инкубировали на термостатированной качалке при 42°C в течение 70 мин. Через определенные промежутки времени шприцем, не нарушая герметичность, отбирали пробы суспензии, в которых способом, описанным ранее [1], устанавливали содержание меченого углерода в биомассе и жидкой среде. Концентрацию биомассы определяли весовым методом

РЕЗУЛЬТАТЫ

При инкубации бактерий с меченым формиатом в присутствии метана происходит потребление меченого углерода формиата из среды и включение его в биомассу (рис. 1). Количество включенного углерода формиата, однако, на 3 порядка ниже использованного количества. Включение углерода формиата в клетки бактерии, очевидно, связано с ассимиляцией CO_2 , образующейся при окислении формиата. Интенсивное потребление формиата из среды и низкий уровень включения его в биомассу свидетельствуют о том, что формиат выступает в основном как энергодающий субстрат, а не как дополнительный источник углерода.

При концентрациях формиата от 0,005 до 0,015 мас. % скорость включения углерода метана в биомассу

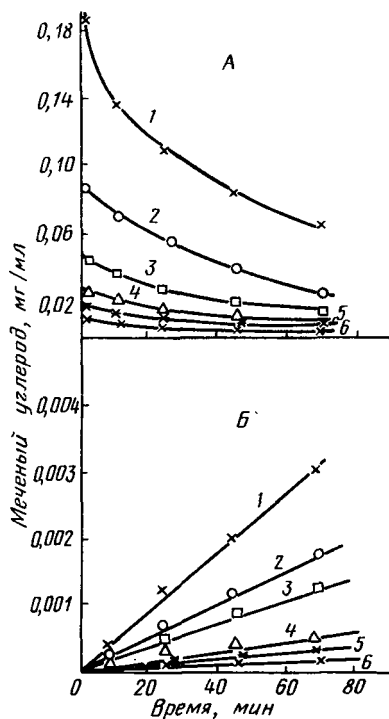


Рис. 1. Потребление углерода формиата из среды (А) и его включение в биомассу (Б) в зависимости от содержания CH_3COONa (мас. %): 1 — 0; 2 — 0,05; 3 — 0,025; 4 — 0,015; 5 — 0,01; 6 — 0,005. Концентрация клеток — 1 г/л, кислорода и метана — по 20 % об., CO_2 — 5 % об.

возрастает на 10—15 %, а при концентрации 0,05 мас. % и выше — снижается (рис. 2). На основании данных, приведенных на рис. 2, строили график зависимости обратных значений скоростей включения углерода метана в биомассу от концентрации формиата. Оказалось, что в данном случае формиат является неконкурентным ингибитором и константа ингибирования равна 19 мМ. Следует отметить, что при

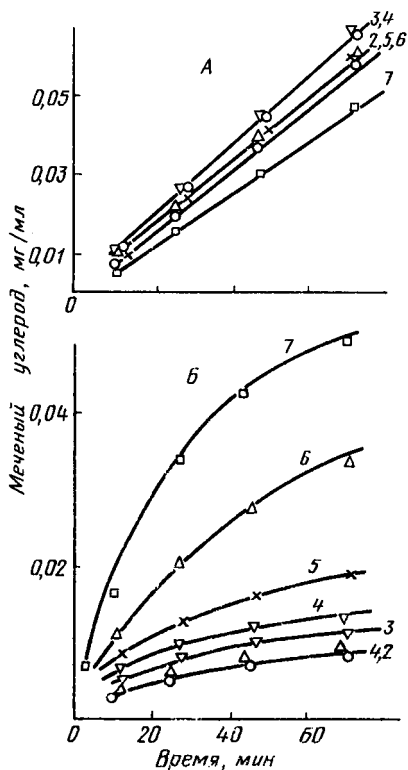


Рис. 2. Включение углерода метана (А) в биомассу и выделение его в среду (Б) при инкубации бактерий в присутствии формиата (мас. %): 1 — 0; 2 — 0,005; 3 — 0,01; 4 — 0,15; 5 — 0,025; 6 — 0,05; 7 — 0,1. Концентрация клеток — 1 г/л кислорода и метана — по 20 % об., CO_2 — 5 % об.

ингибирующих концентрациях формиата наблюдается значительное выделение в среду внеклеточных продуктов, синтезированных из углерода метана (рис. 3), которое по мере повышения концентрации формиата увеличивается. Следовательно, формиат ингибирует не окисле-

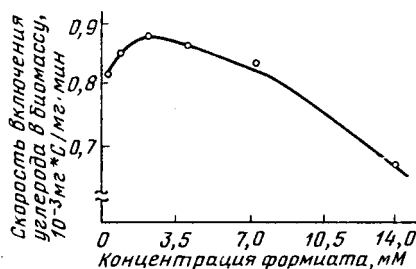


Рис. 3. Зависимость между скоростью включения углерода метана в биомассу и концентрацией формиата в среде.

ние метана метанмонооксигеназой, а его анаболизм — снижается скорость синтеза клеточных компонентов, увеличивается выброс экстрацеллюлярных метаболитов.

Таким образом, формиат при низких (до 0,015 мас.%) концентрациях стимулирует, а при высоких (более 0,05 мас.%) — ингибирует ассимиляцию метана метанотрофом *Methylococcus capsulatus*. Стимулирующий эффект, очевидно, обусловлен тем, что в большинстве случаев рост метанооксиляющих бактерий лимитируется «энергией» [2], поэтому при потреблении небольшого количества формиата в качестве дополнительного источника энергии скорость роста и соответственно скорость биосинтеза клеточных компонентов увеличиваются. При повышении концентрации формиата, однако, его положительное влияние уменьшается. Согласно приведенным данным, существует критическая концентрация, после которой начинается ингибирование процесса. При росте различных штаммов в тех или иных условиях эта концентрация должна быть различной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Живогченко А. Г., Давидова Е. Г., Григорян А. Н. Ассимиляция углерода при росте *Methylococcus capsulatus* на смеси метана и пропана. — Микробиология, 1985, т. 54, с. 341—346. — 2. Anthony C. — The biochemistry of methylo-trophs. Acad. Press., 1982. — 3. Es-

cleston J., Kelley D. P. — J. Gen. Microbiol., 1973, vol. 75, p. 211—221. — 4. Schneider J. D., Wendlandt K. D. — Z. Allg. Microbiol., 1983, vol. 23, p. 259—268. — 5. Schneider J. D., Wendlandt K. D., Bruhl E., Mirschel G. Z. — Allg. Microbiol., 1983, vol. 23, p. 33—36.

Статья поступила 15 июня 1988 г.

SUMMARY

Dynamics of carbon assimilation from ^{14}C labelled substrates — methane and formiate — has been investigated using radioactive indicators technique. It is shown that *Ms. capsulatus* can use formiate as a source of energy, if its concentration in the medium is not higher than critical level when formiate begins to inhibit assimilation of methane. Constant of non-competitive inhibition of assimilation of methane carbon by formiate amounts to 19 mM. With inhibiting concentrations of formiate the release of extracellular products of methane metabolism is much higher.