

УДК 579.22

П.В. Рокитко, В.О. Романовська, Ю.Р. Малащенко

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП, Д03680, Україна, rokitko@serv.imv.kiev.ua

СИНТАБОЛІЗМ НЕРОСТОВИХ СУБСТРАТІВ МЕТАНОТРОФНИМИ БАКТЕРІЯМИ

Облігатні метанокиснювальні бактерії здатні рости тільки на метані. Однак за певних умов (а саме у присутності ростового субстрату) метанотрофи здатні трансформувати неростові для цих бактерій субстрати. Такий процес одержав назву кометаболізму. Нами показано, що метанотрофи спроможні до спільної асиміляції двох неростових субстратів, наприклад, метанолу та субстратного аналога метану (етану або окису вуглецю), результатом чого є синтез біомаси. Встановлено, що метанотрофи окиснюють етан (або окис вуглецю) завдяки субстратній неспецифічності метанмонооксигенази (ММО). Відновні еквіваленти для ММО можуть бути отримані при дегідруванні іншого неростового субстрату – метанолу та інтермедіатів його окиснювання – формальдегіду та форміату. Цей процес названо синтаболізмом. Таким чином, показано, що синтаболізм неростових субстратів у метанотрофів реалізується внаслідок субстратної неспецифічності ММО та спряженості процесів окиснення двох неростових субстратів, які забезпечують ріст і розмноження клітин.

К л ю ч о в і с л о в а: метанотрофи, метанмонооксигеназа, неростовий субстрат, кометаболізм, синтаболізм.

Метанотрофні бактерії здатні кометаболізувати аналоги метану, а також деякі інші органічні речовини. Часто такі сполуки (наприклад, хлоровані аліфатичні вуглеводні, у тому числі етилен; 1,2-цис-дихлоретилен; 1,2-транс-дихлоретилен; хлорид винілу; толуол; фенол і крезол тощо) є токсичними та дуже важко розкладаються і внаслідок цього забруднюють довкілля. Під кометаболізмом мають на увазі процес трансформації неростових субстратів у присутності ростового субстрату. Ферментативний механізм кометаболізму неростових субстратів у метанотрофних бактерій реалізується завдяки спряженості процесів окиснювання ростового субстрату (метану) і субстрату, що кометаболізується (наприклад, етану) [1]. Кометаболізм зазвичай завершується внаслідок накопичення токсичних продуктів.

Метою нашого дослідження було вивчення кометаболізму двох неростових субстратів, при якому відбувається синтез біомаси, метилотрофними бактеріями.

©П.В. Рокитко, В.О.Романовська, Ю.Р. Малащенко



Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були штами облигатних метанокиснювальних бактерій *Methylomonas rubra* 15ш та *Methylococcus thermophilus* 111п [2].

Культивування метанокиснювальних бактерій проводили на рідкому й агаризованому середовищі К, (г/л): $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ – 0,4; KH_2PO_4 – 0,4; NaCl – 0,3; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,3; $FeCl_3 \times 6H_2O$ – 0,001; $(NH_4)_2SO_4$ – 0,5 (або KNO_3 – 1,0) методами, які було описано раніше [3].

Як неростові субстрати, використовували метанол, етан та окис вуглецю в різних концентраціях у залежності від мети окремого досліджу. У рідке середовище вносили метанол у концентрації від 0 до 50 мМ. Концентрація етану в повітряно-газовій суміші становила 5 - 20 об.%, окису вуглецю 0 - 10 об.%.

Після внесення інокулюму метанокиснювальних бактерій колби ставили на качалки при температурі 30 °С (для штаму *Methylomonas rubra* 15ш) або при 55 °С (для штаму *Methylococcus thermophilus* 111п). Бактерії культивували протягом 48 - 72 год.

Бактеріологічну чистоту вирощених культур контролювали методом посіву на агаризовані середовища з іншими джерелами вуглецю: глюкозо-картопляний (ГКА) і м'ясосептонний агар (МПА).

Швидкість окиснювання газоподібних субстратів інтактними (у стані спокою) клітинами визначали за зміною концентрації субстратів у реакційній суміші: кисню – полярографічно, вуглеводнів – газохроматографічно. В експериментах використовували хроматографічно чисті гази: CH_4 і C_2H_6 (99,9%). Необхідні концентрації метану й етану в полярографічній кюветі створювали способом введення в неї певних об'ємів буферного розчину, який був попередньо насичений відповідним газом. Проби (5 мкл) відбирали з полярографічної кювети (з інтервалом 1 хв) і вводили в хроматограф для визначення концентрації метану або етану [3].

Швидкість утворення продуктів монооксигенування етану або метану (етанолу або метанолу, відповідно) визначали газохроматографічно [3].

Швидкість споживання енергогенеруючих косубстратів визначали: метанолу – газохроматографічно, за зміною його концентрації [3]; формиату – за витратами NaOH, як титранту, що компенсує підвищення рН, яким супроводжується споживання формиату.

Результати та їх обговорення

Тип кометаболізму, відмінною рисою якого є використання двох неростових субстратів у енергетичних і конструктивних процесах, що приводить до синтезу біомаси, названо синтаболізмом. Синтаболізм уперше описав Ю.Р. Малашенко [5, 6]. Однак основні закономірності, що характеризують цей процес, не було опубліковано. Тому у статті ми розглянемо експериментальні дані, що підтверджують синтаболізм неростових субстратів у метанокиснювальних бактерій. У цілому, за даними Ю.Р. Малашенка, ферментативний механізм синтаболізму неростових субстратів у метанотрофів реалізується завдяки субстратній неспецифічності метанмонооксигенази (ММО), та спряженості процесів окиснення двох неростових субстратів, які забезпечують ріст і розмноження клітин (наприклад метанолу та етану, або метанолу та СО). Такий механізм підтверджується наступними результатами.

Встановлено, що *Methylomonas rubra* 15ш ріс на метанолі тільки за низького його вмісту в середовищі (25 мМ). При цьому ріст характеризувався



незначною ефективністю й супроводжувався накопиченням формальдегіду в середовищі (табл. 1). Із збільшенням концентрації метанолу (75 мМ) ріст практично припинявся і концентрація формальдегіду збільшувалася. Відомо, що метанол є першим продуктом окиснювання метану, який далі дегідрується метанолдегідрогеназою (МДГ) до формальдегіду. На рівні формальдегіду відбувається розгалуження метаболізму. Частина формальдегіду витрачається на біосинтез клітини, інша частина окиснюється до CO_2 (енергетичний метаболізм). Співвідношення цих процесів, очевидно, визначає здатність бактерій залучати метанол до біосинтезу. Інший досліджений штаб (*Methylococcus thermophilus* 111п) не ріс на метанолі, хоча були перевірені різні умови культивування: концентрація метанолу в рідкому середовищі від 2,5 до 50,0 мМ; інкубація на агаризованому середовищі в парах метанолу; різні джерела азотного живлення – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ або KNO_3 ; концентрація кисню в газовій фазі від 5 до 20 об. %; культивування в присутності вуглекислого газу (5 % CO_2 у газовій фазі та 0,5 г/л NaHCO_3 у середовищі); температура від 42 °С до 55 °С.

Після 3 - 4 днів культивування формальдегід було виявлено (до 1 мМ) у середовищі з метанолом, яке було інокульовано *Methylococcus thermophilus* 111п (табл. 1). Тобто, метанол окиснювався внесеними клітинами, однак біомаса не збільшувалася. Причина накопичення формальдегіду могла бути обумовлена спроможністю метанмонооксигенази окиснювати метанол [7] (одночасно з окиснюванням метанолу метанолдегідрогеназою). Очевидно, активність утворення формальдегіду з метанолу (два ферменти — ММО і МДГ — продукують цей інтермедіат), була вищою, ніж активність окиснювання формальдегіду до CO_2 .

Таблиця 1

Показники синтезу біомаси при рості облигатних метанокиснювальних бактерій на метанолі

Початкова концентрація CH_3OH (мМ)	Спожитий CH_3OH (мМ) в 1 л середовища	Біомаса (г/л)	$Y_{\text{CH}_3\text{OH}}$ (г біомаси на г метанолу)	Накопичені продукти (мМ) в 1 л середовища	
				НСОН	CO_2
<i>Methylomonas rubra</i> 15ш					
12,5	6,25	0,07	0,35	0,83	2,68
25	18,75	0,16	0,33	1,67	9,19
75	21,88	0,11	0,16	2,50	15,1
<i>Methylococcus thermophilus</i> 111п					
12,5	3,20	0	0	0,70	2,50
25	9,26	0	0	0,83	8,43

Грунтуючись на вищенаведених результатах, метанол використовували в експериментах як один з неростових субстратів. Як другий неростовий субстрат використовували етан.

Показано, що метанотрофи здатні окиснювати етан завдяки субстратній неспецифічності ММО – ферменту, який окиснює метан. Крім того, для окиснювання етану метанотрофам необхідний косубстрат, який генерує відновні еквіваленти для кометаболізму неростового субстрату [8, 9]. Відновні еквіваленти для ММО можуть бути отримані при дегідруванні метанолу та інтермедіатів його окиснювання – формальдегіду та форміату [1].

Полярнографічно було показано, що *Methylococcus thermophilus* 111п без косубстратів окиснював етан із низькою, загасаючою швидкістю, очевидно,



тільки за рахунок ендогенних запасів енергії. Газохроматографічно продуктів окиснювання етану при цьому не було виявлено. Окиснювання етану в присутності косубстрату (наприклад, форміату) відбувалося активніше. Процес супроводжувався накопиченням продуктів окиснювання етану (етанолу, ацетальдегіду, ацетату) і продукту окиснювання форміату (вуглекислоти). Встановлено також, що *Methylococcus thermophilus* 111п, який не асимілює метанол як єдине джерело вуглецю й енергії, був здатний рости на метанолі (20 мМ) у присутності етану (20 об.%). При цьому формальдегід не накопичувався.

Більш докладно ми розглянемо процес перетворення метанолу на біомасу в іншого метанотрофа *Methylomonas rubra* 15ш. Як впливає з наведених результатів (табл. 1, рис. 1), ефективність перетворення метанолу на біомасу збільшувалася в присутності етану. Співвідношення продуктів окиснення етану (етанолу, ацетальдегіду, ацетату) залежало від концентрації метанолу (при постійній концентрації етану). Максимальний вихід біомаси спостерігався при концентраціях метанолу 20 мМ – близько 0,3 г/л. При цьому етан окиснювався до оцтового альдегіду й ацетату пропорційно використаному метанолу (рис. 1).

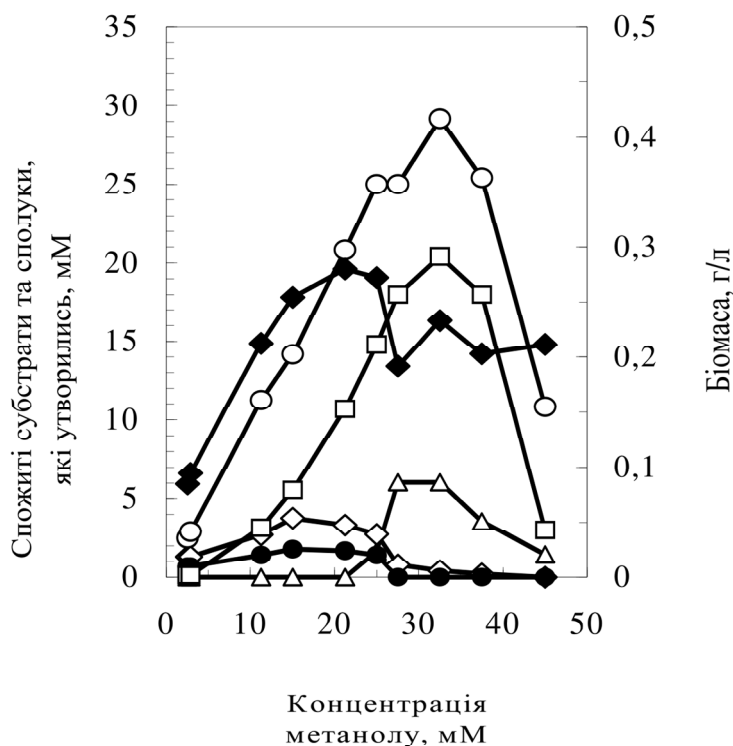


Рис. 1. Вплив початкової концентрації метанолу в середовищі на ріст *Methylomonas rubra* 15ш. (◆) біомаса, (○) CO₂, (△) етанол, (◇) ацетальдегід, (●) ацетат, (□) спожитий метанол. Концентрація етану в газово-повітряній суміші – 5 об.%

Вихід біомаси від метанолу (Y_{CH_3OH}) свідчить, що вуглець метанолу, який було використано і витрачено на синтез біомаси і, можливо, деяку кількість додаткового вуглецю було отримано при окиснюванні етану (відомо, що ацетат може залучатися до метаболізму метанотрофів [10]). Оскільки вуглекислого газу не виявлено, то, очевидно, весь метанол було трансформовано у біома-

су. Таким чином, єдиною реакцією перетворення метанолу, спряженою з монооксигенуванням етану, могло бути окиснювання метанолу метанодегідрогеназою. Окиснювання етанолу (продукту монооксигенування етану) через оцтовий альдегід до ацетату також може давати джерело відновника для ММО.

При високих концентраціях метанолу (понад 30,0 мМ), можливо, виникала конкуренція процесів окиснювання етанолу й метанолу за МДГ, у результаті чого етанол виділявся в культуральне середовище (рис. 1). У цьому випадку спостерігалось інтенсивне окиснювання метанолу до вуглекислого газу, а ефективність синтезу біомаси була низькою. Співокиснення етану було пропорційним кількості трансформованого в біомасу метанолу. Результатом спільної трансформації метанолу й етану клітинами метанотрофів був синтез клітинної біомаси. Даний процес одержав назву синтаболізм неростових субстратів, на відміну від процесу кометаболізму, що закінчується одержанням продуктів метаболізму, але не ростом клітинної популяції.

Для демонстрації синтаболізму неростових субстратів у метанотрофів використовували також інший субстрат – окис вуглецю (СО). Відомо, що метанотрофи не ростуть на СО, як єдиному джерелі вуглецю. Встановлено, що СО має високу спорідненість до ММО, а продукт його монооксигенування (вуглекислий газ) не токсичний.

Як видно з таблиці 2, ріст двох досліджених штамів метанотрофів за низьких концентрацій метанолу (12,5 - 25,0 мМ) у присутності СО характеризувався більш високим виходом біомаси, ніж коли метанол був єдиним субстратом. Стехіометрія процесу росту залежала від концентрації метанолу (табл. 2). При рості *Methylomonas rubra* 15ш відношення витраченого СО₂ і метанолу зменшувалося від 1,25 (при 12,5 мМ метанолу) до 0,41 (при 75,0 мМ метанолу). Це корелювало зі зменшенням Y_C .

Таблиця 2

Показники синтезу біомаси при рості метанотрофів на суміші субстратів (метанол + СО) або на метанолі

Початкова концентрація субстратів		Спожиті субстрати (мМ) в 1 л середовища		Біомаса (г/л)	Y_{CH_3OH} (г біомаси на г метанолу)	*Y_C (г С біомаси на г С метанолу)	Накопичені продукти (мМ) в 1 л середовища	
СО (об. %)	Метанол (мМ)	СО	CH ₃ OH				НСОН	СО ₂
<i>Methylomonas rubra</i> 15sh								
0	12,5	**	6,25	0,07	0,35	0,44	0,83	2,68
0	25,0	**	18,75	0,20	0,33	0,42	1,67	9,19
0	75,0	**	21,88	0,11	0,16	0,20	2,50	15,1
10	12,5	13,65	10,90	0,23	0,65	0,82	0	15,6
10	25,0	18,75	18,75	0,36	0,60	0,75	0	23,4
10	75,0	7,69	18,75	0,18	0,30	0,38	1,17	18,2
<i>Methylococcus thermophilus</i> 111p								
0	12,5	-	3,2	0	0	0	0,70	2,50
0	25,0	-	9,26	0	0	0	0,83	8,43
10	12,5	13,3	8,75	0,16	0,57	0,72	0	15,6
10	25,0	10,5	13,13	0,19	0,45	0,57	0,40	15,8

П р и м і т к а:

$^*Y_C = (32,0/25,5) Y_{CH_3OH}$, де 32,0 – молекулярна вага метанолу, 25,5 – молекулярна вага сполуки

CH₂O_{0,5}N_{0,25}, що відображає склад біомаси метанотрофних бактерій

**В цих варіантах СО не додавали



Отже, спільна трансформація метанолу й субстратного аналога метану (етану або CO) метанотрофами приводить до росту клітин. Кожний із цих субстратів окремо не є ростовим для метанотрофів. Таким чином, синтаболізм – це трансформація двох неростових субстратів, результатом якої є синтез біомаси (рис. 2). Цей процес реалізується завдяки, по-перше, субстратній неспецифічності метанмонооксигенази, і, по-друге, наявності точок спряження способів перетворення двох неростових субстратів:

- дегідрування метанолу;
- монооксигенування другого субстрату (етану або CO).

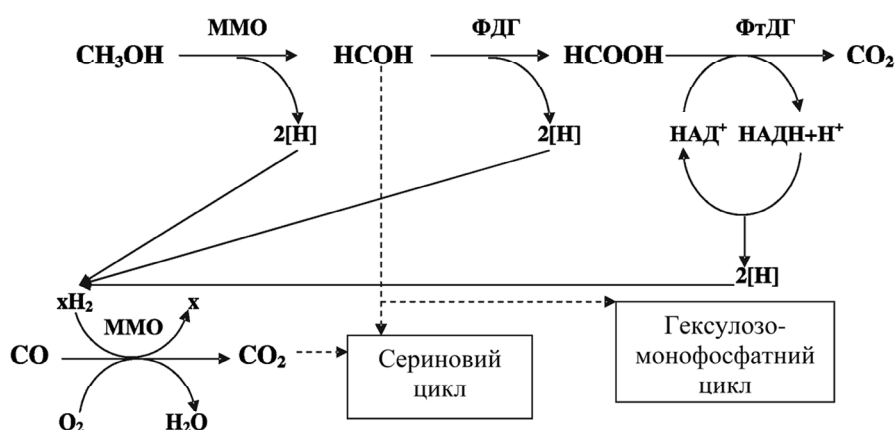


Рис. 2. Схема синтаболізму метанолу та окису вуглецю метанотрофними бактеріями

На відміну від синтаболізму, інші варіанти кометаболізму являють собою трансформацію неростового субстрату до певного продукту разом з використанням ростового субстрату (при цьому можливий ріст мікроорганізмів) або разом з використанням неростового енергогенеруючого субстрату (ріст мікроорганізмів при цьому неможливий).

У цілому ж синтаболізм неростових субстратів у бактерій – це явище, що розширює уявлення мікробіологів стосовно:

- діапазону трофічних властивостей бактерій у природі;
- виняткового пристосування бактерій до екстремальних умов їх існування, наприклад, у разі відсутності традиційних джерел живлення;
- здатності бактерій трансформувати в природних умовах неростові субстрати за наявності декількох субстратів, що обумовлено, насамперед, неспецифічністю певних ферментів;
- можливості бактерій втягувати в обмінні процеси важкодоступні, а іноді й токсичні сполуки й, таким чином, захищати навколишнє середовище від антропогенного забруднення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Малашенко Ю.Р., Соколов И.Г., Романовская В.А. Микробный метаболизм неростовых субстратов. — К.: Наук. думка, 1991. — 198 с.
2. Романовская В.А., Столяр С.М., Малашенко Ю.Р. Систематика метилотрофных бактерий. — К.: Наук. думка, 1993. — 194 с.
3. Малашенко Ю.Р., Романовская В.А., Троценко Ю.А. Метанокисляющие микроорганизмы. — М.: Наука, 1978. — 195 с.
4. Баславская С.С., Трубецкова О.М. Практикум по физиологии растений. — М.: Изд-во МГУ, 1964. — 326 с.
5. Малашенко Ю.Р., Романовская В.А., Соколов И.Г. Особенности метаболизма и управление ростом метанокисляющих бактерий // Регуляция биохимических процессов у микроорганизмов: Материалы Всесоюз. симпоз. — Пущино: ОНТИ НЦБИАН СССР, 1979. — С. 265 - 272.
6. Malashenko Y.R. Syntabolism, the transformation of non-growth substrates up to biomass by obligate methane-oxidizing bacteria // Abstr. 4th Int. Symp. Microbial growth on C₁-compounds. — Washington, 1984. — Thes. P. 2 - 10.
7. Cornish A., Nicholls K.M., Scott D., Hunter B.K., Aston W.J., Higgins I.G., Sanders J.K.M. In vivo ¹³C NMR investigation of methanol oxidation by the obligate methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b//*J. Gen. Microbiol.* — 1984. — 130. — P. 2565 - 2575.
8. Romanovskaya V.A., Malashenko Yu.R., Sokolov I.G. The competitive inhibition of the microbial oxidation of methane by ethane // In: Microbial Production and Utilization of Gases (H₂, CO, CH₄) / Eds.: H.G. Schlegel, G. Gottschalk, N. Pfenning, E. Goltze KG, Gottingen, 1976. — P. 345 - 351.
9. Stirling D.J., Dalton H. The fortuitous oxidation and cometabolism of various carbon compounds by whole-cell suspensions of *Methylococcus capsulatus* (Bath)//*FEMS Microbiol. Lett.* — 1979. — 5. — P. 315 - 318.
10. Patel R.N., Hoare S.L., Hoare D.S. 1-C¹⁴ Acetate assimilation by obligate methylotrophs, *Pseudomonas methanica* and *Methylosinus trichosporium*//*Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* — 1979. — 45. — P. 499 - 511.

П.В. Рокитко, В.А. Романовская, Ю.Р. Малашенко

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев, МСП, Д03680, Украина, rokitko@serv.imv.kiev.ua

СИНТАБОЛИЗМ НЕРОСТОВЫХ СУБСТРАТОВ МЕТАНОТРОФНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Реферат

Облигатные метанокисляющие бактерии способны расти только на метане. Однако, в определенных условиях (а именно, в присутствии ростового субстрата) метанотрофы могут трансформировать неростовые для этих бактерий субстраты. Такой процесс получил определение кометаболизм. Нами показано, что метанотрофы спо-



способны к совместной ассимиляции двух неростовых субстратов, например, метанола и субстратного аналога метана (этана или окиси углерода), в результате чего синтезируется биомасса. Установлено, что метанотрофы окисляют этан (или окись углерода) благодаря субстратной неспецифичности метанмонооксигеназы (ММО). Восстановительные эквиваленты для ММО могут быть получены при дегидрировании другого неростового субстрата – метанола и интермедиатов его окисления – формальдегида и формиата. Этот процесс назван синтаболизмом. Таким образом, показано, что синтаболизм неростовых субстратов у метанотрофов реализуется вследствие субстратной неспецифичности ММО и сопряженности процессов окисления двух неростовых субстратов, которые обеспечивают рост и размножение клеток.

К л ю ч е в ы е с л о в а: метанотрофы, метанмонооксигеназа, неростовой субстрат, кометаболизм, синтаболизм.

P.V. Rokytko, V.O. Romanovska, J.R. Malashenko

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology Nat. Acad. Sci. Ukraine,
Zabolotny str., 154, Kyiv, Ukraine*

SINTABOLISM OF NON-GROWTH SUBSTRATES BY METHANOTROPHIC BACTERIA

Summary

The obligate methane oxidizing bacteria are capable to grow only on methane. However, under certain conditions (namely, in presence of growth substrate) methanotrophs can transform non-growth substrates. Such process has obtained the definition "cometabolism". It was shown by us, that methanotrophs are capable to joint assimilation of two non growth substrates, for example, methanol and substrate analogue of methane (ethane or carbon oxide). This process results in biomass synthesis. It is established, that methanotrophs oxidize ethane (or carbon oxide) owing to methane monoxygenase's (ММО) non specificity to substrate. The reducing equivalents for ММО can be obtained at dehydrogenation of other non-growth substrate - methanol and intermediates of its oxidation - formaldehyde and formiate. This process is named "sintabolism". Thus, it is shown, that the sintabolism of non-growth substrates by methanotrophs is realized owing to substrate non specificity of the ММО and interlinking of processes of oxidation of two non-growth substrates which provide growth and reproduction of the cells.

К e y w o r d s: methanotrophs, methane monoxygenase, non-growth substrate, cometabolism, sintabolism.

