

A-27621

АКАДЕМИИ НАУК СССР  
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

---

На правах рукописи

ЛЕБЕДИНСКИЙ  
Александр Владимирович

УДК 579.1.017.7-266.2+695

ДЕНИТРИФИКАЦИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
ОДНОУГЛЕРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Специальность 03.00.07 - микробиология

А в т о р е ф е р а т  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 1984

АКАДЕМИИ НАУК СССР  
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

---

На правах рукописи

ЛЕБЕДИНСКИЙ  
Александр Владимирович

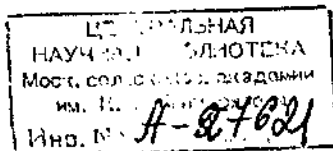
УДК 579.1.017.7-266.2+695

ДЕНИТРИФИКАЦИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
ОДНОУГЛЕРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Специальность 03.00.07 - микробиология

А в т о р е ф е р а т  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 1984



# Микробиология

Работа выполнена в Институте микробиологии АН СССР

Научный руководитель: член-корреспондент АН СССР,  
профессор Г.А.ЗАВАРЗИН

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Г.А.ДУБИНИНА  
кандидат биологических наук К.А.ТРОЩЕНКО

Ведущая организация - Тимирязевская сельскохозяйственная академия,  
кафедра микробиологии

Защита состоится "29" мая 1984 г. в 12 час. 00 мин.  
на заседании специализированного совета Д 002.54.01 при Институте  
микробиологии АН СССР по адресу: 117312, г. МОСКВА, В-312,  
Проспект 60-летия Октября, д.7, корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института  
микробиологии АН СССР

Автореферат разослан "29" мая 1984 г.

Ученый секретарь  
специализированного совета

Л.Н.Москаленко

## В В Е Д Е Н И Е

Актуальность проблемы. Метилотрофные денитрификаторы способны сочетать два процесса, которые по отдельности интенсивно изучаются: метилотрофию и денитрификацию. Метилотрофная денитрификация остается малоизученной, хотя представляет значительный практический и теоретический интерес.

Одним из экономичных способов очистки сточных вод от соединений азота является сочетание бактериального аэробного процесса нитрификации с последующей анаэробной стадией, в ходе которой микроорганизмы в процессе денитрификации восстанавливают нитрат в  $N_2$  за счет экзогенного метанола.

При денитрификации нередко происходит накопление нитрита, окиси и закиси азота. Состав продуктов при метилотрофной денитрификации и его зависимость от внешних условий практически не изучены. Накопление нитрита и окиси азота в очистных сооружениях нежелательно ввиду их токсичности. Условия, влияющие на накопление закиси азота микроорганизмами, заслуживают изучения с позиций глобальной микробиологии, так как этот газ влияет на озоновый слой атмосферы (Crutzen, 1981).

Основным агентом денитрификации с метанолом считаются представители рода *Nitrosomonas* (Harder, Attwood, 1978). Единственным из относящихся к гифомикробам организмом, для которого показана денитрификация с метанолом, является *Paracoccus denitrificans*. Причиной того, что окисление метанола редко сочетается с восстановлением нитрата, могут быть особенности функционирования электрон-транспортной цепи (ЭЦ) при осуществлении этих процессов. Считается, что метанол отдает электроны в ЭЦ на уровне цитохрома с, минуя цитохром b (Anthony, 1975; Netrusov et al., 1977; Bamforth, Quayle, 1978b), от которого принимает электроны нитрат (John, Whitley, 1970; Miyata, 1971). Таким образом, перенос электронов от метанола к нитрату может быть затруднен. Ферменты денитрификации и их связь с ЭЦ у гифомикробов не изучены.

Теоретическим стимулом для изучения метилотрофной денитрификации является вообще недостаточная изученность основных агентов процесса - представителей *Nitrosomonas*, что отражается в отсутствии детальной систематики рода. Представляют в частности интерес

вопрос, насколько широко распространена среди гифомикробов способность к денитрификации и насколько однородна по свойствам группа гифомикробов, способных к денитрификации.

Цель и задачи исследования. Целью работы было изучение особенностей микробиологии, физиологии и биохимии возбудителей денитрификации с метанолом и выяснение влияния различных факторов на интенсивность процесса и состав продуктов.

Конкретно задачи исследования состояли в следующем.

1. Получить накопительные и чистые культуры метилотрофных денитрификаторов. Проверить, действительно ли в накопительных культурах доминируют гифомикробы, и не способна ли сопутствующая микрофлора к метилотрофной денитрификации.

2. Проверить способность ряда штаммов гифомикробов, выделенных другими авторами в аэробных условиях, на способность к денитрификации с целью оценить распространенность этого свойства среди гифомикробов. Сравнить гифомикробов - денитрификаторов по ряду признаков (возможность роста с различными акцепторами, образуемые продукты и т.д.) с целью оценить однородность свойств группы гифомикробов, способных к денитрификации.

3. Выявить влияние внешних факторов - pH, аэрации, концентрации нитрата, нитрита, метанола, наличия микроэлементов на интенсивность процесса метилотрофной денитрификации и на состав образуемых продуктов.

4. Установить у метилотрофных денитрификаторов тип ферментов, окисляющих метанол и восстанавливающих нитрат. Выяснить, возможен ли перенос электронов от метанолдегидрогеназы к нитратредуктазе.

Научная новизна работы. Впервые описан состав продуктов, образуемых метилотрофными денитрификаторами, и влияние на него внешних факторов. Показано, что на состав продуктов денитрификации с метанолом большое влияние оказывают ионы  $Cu^{2+}$ , в присутствии которых в стабильных анаэробных условиях единственным продуктом становится  $N_2$ . Показано, что переход метилотрофных денитрификаторов от аэробного линейного роста к денитрификации в анаэробных условиях способствует образованию ими закиси азота ввиду большей чувствительности  $N_2O$ -редуктазы к репрессии азотной по сравнению с другими редуктазами денитрификации.

Установлено, что термофильные бактерии, способные к денитрификации, представляют собой гетерогенную группу. Они значительно различаются по скорости и эффективности анаэробного роста с нитратом и метанолом, по составу продуктов, образуемых в отсутствие ионов  $\text{Cu}^{2+}$ , по способности к росту с метанолом и  $\text{N}_2\text{O}$ .

Обнаружено, что *Thermomicrobium* 2-3 в определенных условиях осуществляет практически стехиометрическое восстановление нитрата в нитрит за счет метанола, что не укладывается в рамки существующих представлений об ЭТЦ мезофильных денитрификаторов (Vanforth, Quayle, 1978в; Meiberg, 1979). Проведено энзимологическое исследование обнаруженного явления, показавшее возможность переноса электронов от цитохрома с к цитохрому b у *Thermomicrobium* 2-3.

Выделен штамм бактерий, способных к денитрификации с метанолом и отличающихся морфологически от термофильных бактерий и *P. denitrificans*. Таким образом, расширены представления о круге организмов, способных к осуществлению процесса денитрификации с метанолом.

Практическая ценность исследования. Полученные данные по зависимости летучести денитрификации с метанолом и состава ее продуктов от внешних условий могут иметь значение для практики биологической очистки сточных вод. Показано, что образование нежелательных промежуточных продуктов (нитрит, окись и закись азота) можно избежать, обеспечив доступность ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и стабильность анаэробных условий.

Метанол может быть экономичным субстратом для получения кормового микробного белка. При аэробном культивировании проблемой производства является расход энергии на аэрирование. При наличии штамма, дающего высокий урожай в анаэробных условиях, замена кислорода на нитрат может быть экономически выгодной. Нами выделен штамм *Thermomicrobium* 2-3, дающий при анаэробном росте с метанолом и нитратом высокий урожай биомассы в расчете на потребленный метанол, сравнимый с урожаями, которые удавалось получать при аэробном культивировании бактерий и дрожжей на метаноле. Выявлены условия анаэробного культивирования *Thermomicrobium* 2-3, способствующие высокому урожаю, высокому содержанию белка и высокому содержанию поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты в клетках.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на Всесоюзной конференции "Термофильные микроорганизмы в природе и прак-

тике народного хозяйства" (г. Москва, 1983г.) и на Всесоюзном семинаре "Закономерности роста микроорганизмов" (г. Пушкино, 1983г.).

Публикации. Основные материалы диссертации опубликованы в шести статьях.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения, выводов и списка литературы. Материалы изложены на 177 страницах машинописного текста, включая 9 таблиц, 8 схем и 29 рисунков. Список литературы содержит 229 наименований работ - 26 на русском и 203 на иностранных языках.

Место проведения работы. Работа проводилась в Институте микробиологии АН СССР в Отделе литотрофных микроорганизмов (заведующий Отделом - член-корреспондент АН СССР, профессор Г.А. Заварзин). Часть экспериментальной работы проведена совместно с кандидатом биологических наук И.Я. Зедениной.

#### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе был использован штамм *Nitrosomonas* 2-3, выделенный нами из низового болота (Абрамцево, Подмосковье), штаммы *Nitrosomonas* 2-111 и 2-113, выделенные нами из поймы р. Сетунь, и штаммы гифомикробов, полученные от других исследователей. Штамм *Nitrosomonas* 2V был выделен Г.А. Заварзинным; штаммы 03, 04, 05, 07, 08 и 010 получены от Б.В. Громова; штамм 3 - от Ю.А. Тропченко; штаммы МР-201 и МА-150 - от Д.И. Никитина.

Были использованы также предоставленные нам Р.С. Головачевой накопительные культуры термотрофных нитрификаторов, в которых стабильно присутствовал *Nitrosomonas* sp.

В работе мы использовали также образцы активного ила из аэротенков Люблинской водослестной станции и из очистных сооружений, осуществляющих денитрификацию проточка п/о "Азот" в г. Щелкино. Из Гельсингских образцов активного ила нами были выделены штаммы 2-100 и 2-121 - метилотрофные денитрификаторы, не относящиеся к *Nitrosomonas*. При их изучении для сравнения нами была использована референционная культура *Paracoccus denitrificans* штамм Vogt.

Для выделения и культивирования метилотрофных денитрификаторов использовали среду 337 (Nirsch, Centi, 1964) с нитратом и метанолом. В некоторых случаях вносили дополнительно микроэлементы.

Анаэробное культивирование проводили в бутылках, которые закрывали резиновыми пробками и заполняли инертным газом. Пробы для анализа газов и пробы суспензии отбирали шприцем. Анализ газов производили с помощью хроматографа ДХМ-8М с катарометром как детектором на колонках с Перапак Q и молекулярным ситом IZX с газом-носителем водородом. При построении калибровочных кривых использовали  $N_2$ ,  $N_2O$  и  $O_2$  из баллонов, а  $NO$  синтезировали методом, основанным на взаимодействии  $KNO_2$  с  $KI$  в 50%  $H_2SO_4$  (Миллер, Плаук, 1968) в атмосфере инертного газа.

Пробы культуры центрифугировали, в осадке определяли содержание белка (Lowry et al., 1951) и поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты (Zlarsky, Law, 1960). В супернатанте определяли концентрации нитратов, нитритов и метанола. Нитраты определяли с фенолдисульфокислотой, нитриты - с сульфанилсоевой кислотой и  $N$ -нафтилэтиленадiamiном (Nicholas, Nason, 1957). Метанол определяли методом биохроматного окисления или на хроматографе ДХМ-8М с пламенно-ионизационным детектором и колонкой с Перапак Q.

Опыты с суспензиями, в которых не требовалось аэрирование, ставили в шприцах на 50 мл с легко подвижными стеклянными поршнями. Опыты, в которых требовалось аэрирование суспензии, ставили в ферментере "Biotek" с кислородным электродом при интенсивном перемешивании.

Активность ферментов определяли в неочищенном экстракте из клеток *Nurhomicobium* Z-3. Суспензия клеток разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора МЗБ при мощности 500 ватт и частоте 20 кГц в течение 5 минут; в качестве источника ферментов использовали супернатант после центрифугирования при 20000  $xg$  в течение 40 минут. Активность ферментов определяли спектрофотометрическими методами. Все реакции проводили в анаэробных условиях в трубках Тунберга, чтобы избежать самопроизвольного окисления восстановленных красителей. Метаноладегидрогеназу определяли по модифицированному методу Антона и Затмана (Anthony, Zatman, 1967); формальдегиддегидрогеназу и формилдегидрогеназу - методами, описанными Джонсоном и Квейтом (Johnson, Quayle, 1964). Нитрат- и нитрит-редуктазы определяли по изменению поглощения при 600  $m\mu$  проходящего при окислении метальмогена, предельно точно восстановленного дитиснитом. Метод был аналогичен предложенному Кристьянссоном и Холочером (Kristjansson, Hollocher, 1980) для опреде-



## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Выделение метилотрофных денитрификаторов.

При посеве проб ила низовых болот и речной поймы в среду с метанолом и нитратом в анаэробных условиях развивались накопительные культуры, где доминировала гифомикробы. Эти организмы легко распознаются под световым микроскопом по моно- или биполярным нитевидным выростам клеток (гифам), на конце которых почкованием образуются дочерние клетки. Нами были выделены три чистые культуры *Nurhomicrobium* Z-3, Z-111 и Z-113.

Кроме того, при выделении метилотрофных денитрификаторов из активного ила очистного сооружения, осуществляющего денитрификацию промышленного стока за счет смеси метанола и отходов его производства с хозяйственно-фекальными сточными водами, мы получили две чистые культуры бактерий, способных к денитрификации с метанолом - штаммы Z-121 и Z-100. Штамм Z-121 представляет собой грамтризательный кокк, морфологически сходный с *Fe, denitrificans* и, подобно ему, способный к автотрофному росту в атмосфере  $H_2 + O_2 + CO_2$ . Штамм Z-100 - грамтризательная палочка, морфологически отличная от *Fe, denitrificans* и неспособная к автотрофному росту в атмосфере  $H_2 + O_2 + CO_2$ . Выделение штамма Z-100 показывает, что круг организмов, способных к денитрификации с метанолом, не ограничивается гифомикробами и *Fe, denitrificans*, как это считалось ранее.

### 2. Распространенность способности к денитрификации среди гифомикробов.

Гифомикробы легко выделяются из различных естественных местообитаний как метилотрофные денитрификаторы. Многие штаммы гифомикробов, выделенные в аэробных условиях, не проверялись на способность к денитрификации. Возникает вопрос, не является ли вообще подавляющее большинство гифомикробов денитрификаторами? Для исследования этого вопроса мы проверили способность ряда штаммов гифомикробов к росту с различными акцепторами электронов (нитрат, закись азота, кислород воздуха). Результаты представлены в табл. I. Штаммы *Nurhomicrobium* Z-3, Z-111 и Z-113 выделены нами в ана-

аэробных условиях, остальные штаммы - другими авторами в аэробных условиях.

Таблица I

Рост гифомикробов с различными акцепторами электрона

| Штаммы | Условия роста                                    |  |  |
|--------|--|--|--|
|        | Среда без $\text{KNO}_3$ ; газовая фаза - воздух | Среда с 50 мМ $\text{KNO}_3$ газовая фаза - неон | Среда без $\text{KNO}_3$ ; газовая фаза - $\text{N}_2\text{O}$ |
| Z-3    | +  | ++   | ++   |
| Z-111  | ++   | ++   | + I)   |
| Z-113  | +  | +  | + I)   |
| ZV     | ++   | +  | -  |
| MA-160 | ++   | ++ I)  | -  |
| NR-201 | +  | -  | -  |
| 3      | +  | -  | -  |
| 03     | +  | -  | -  |
| 04     | +  | -  | -  |
| 05     | +  | -  | -  |
| 07     | +  | -  | -  |
| 08     | +  | -  | -  |
| 010    | +  | -  | -  |

Примечание: "+" - не менее чем 5-кратное превышение исходной мутности

"++" - не менее чем 30-кратное превышение исходной мутности

I) - результат получен лишь через 30 суток.

Из табл. I видно, что большинство штаммов, выделенных в аэробных условиях, неспособно к анаэробному росту. Аэробно выделяющиеся штаммы *Nitrosomonas* ZV и MA-160 росли анаэробно с нитратом, но не с закисью азота.

Денитрификаторы, как правило, при проверке оказываются способными расти с  $\text{N}_2\text{O}$  как акцептором (Faure, 1973). Денитрификаторы, не растущие с  $\text{N}_2\text{O}$ , вообще неспособны восстанавливать закись азота, и она является у них единственным газообразным продуктом восстановления нитрата (Hart et al., 1965; Greenberg, Vesker, 1977). Напротив, у *Nitrosomonas* ZV, неспособность расти с закисью азота не связана с неспособностью ее восстанавливать.

О распространенности среди гифомикробов способности к денитрификации позволяют также косвенно судить данные, полученные нами при работе с пятью накопительными культурами термофильных нитрификаторов, предоставленными Р.С.Головачевой. В этих накопительных культурах, инкубируемых при 40-50°, стабильно присутствовали гифомикробы. Логично было предположить, что эти гифомикробы способны к денитрификации. Однако наши попытки выделить их в условиях, способствующих метилотрофной денитрификации, оказались безуспешными. В то же время пересевы в аэробные условия с метанолом приводили к развитию накопительных культур, где доминировали гифомикробы. Таким образом, даже в условиях, благоприятствующих денитрификации, могут обнаруживаться гифомикробы, неспособные к этому процессу.

3. Динамика роста и образования продуктов при денитрификации с метанолом у *Nurhomicrobium 2-3* и *Nurhomicrobium ZV*.

Последующую работу проводили с двумя штаммами гифомикробов - коллекционным *Nurhomicrobium ZV* и выделенным нами *Nurhomicrobium 2-3*, который характеризовался наиболее активным анаэробным ростом с метанолом и нитратом из всех исследованных нами штаммов.

Между процессами денитрификации, осуществляемыми *Nurhomicrobium 2-3* и *Nurhomicrobium ZV*, мы обнаружили существенные различия. Денитрификация на среде 337 с нитратом и метанолом у *Nurhomicrobium ZV* происходила без накопления нитрита. Основным продуктом был  $H_2$ . В качестве промежуточного продукта образовывалась  $H_2O$  (рис. IА). Скорость роста *Nurhomicrobium 2-3* в тех же условиях была значительно выше, и нитрат восстанавливался этим штаммом значительно быстрее; при этом накапливался нитрит, но не  $H_2O$  (рис. IБ).

4. Влияние ионов  $Cu^{2+}$  на денитрификацию с метанолом у *Nurhomicrobium 2-3* и *Nurhomicrobium ZV*.

Исходная среда 337, использованная нами для выделения и культивирования гифомикробов, не включала ионов  $Cu^{2+}$ . В дальнейшем мы обнаружили, что добавление в среду 0,1-20 мкМ  $Cu^{2+}$  приводит к тому, что *Nurhomicrobium 2-3* накапливает значительно меньше нитрита, чем без добавления этого микроэлемента, а урожай биомассы в расчете на перенесенные в ЭЦП электроны возрастает почти вдвое (рис. IВ). Изучение влияния ионов  $Cu^{2+}$  на *Nurhomicrobium ZV* показало, что их добавление не увеличивало ни скорость роста, ни урожай этого штамма. В то же время добавление 0,4 мкМ  $Cu^{2+}$  препятст-

вообще накопления  $H_2O$  этим штаммом и  $H_2$  становится единственным продуктом.

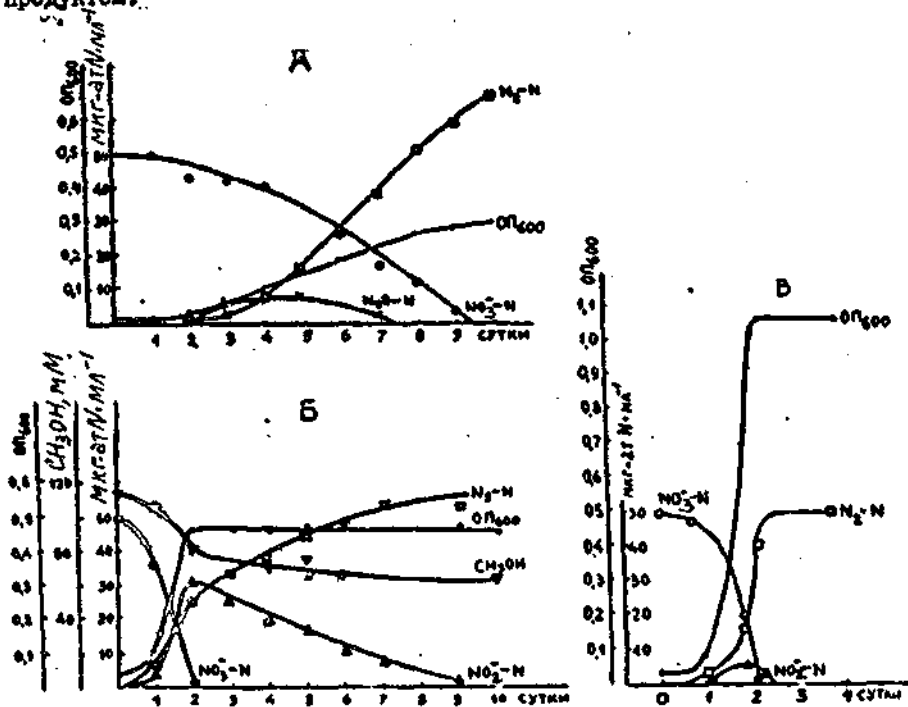


Рис.1 Рост гидрогенов на среде с нитратом и метанолом.

А. *Nurohomogobium ZV* без внесения  $Cu^{2+}$

Б. *Nurohomogobium Z-3* без внесения  $Cu^{2+}$

В. *Nurohomogobium Z-3* с внесением 0,2 мМ  $Cu^{2+}$ .

Ряд данных, появившийся в последнее время в литературе, свидетельствует о том, что  $H_2O$ -редуктаза может быть медьсодержащим ферментом (Iwasaki et al., 1980; Iwasaki, Terai, 1982; Matsubara et al., 1982). Нам обнаружено стимулирующее влияние  $Cu^{2+}$  на способность к восстановлению  $H_2O$  у *Nurohomogobium ZV*. В то же время другой штамм - *Nurohomogobium Z-3* - при анаэробном росте с 50 мМ нитратом не накапливал  $H_2O$ . Рост этого штамма с  $H_2O$  как акцептором возможен с накоплением значительной биомассы без добавления меди; стимулирующего влияния меди на его рост с  $H_2O$  нами не

обнаружено. Хотя мы не проводили оценки фоновой среды от меди, ее содержание было достаточно низким, чтобы позволить обнаружить сильное влияние 0,1 мкМ вносимой меди на накопление нитрата и урожай биомассы при анаэробном росте *Nurhomicobium* Z-3 с нитратом. Таким образом, наши данные позволяют предположить, что у *Nurhomicobium* Z-3  $H_2O$ -редуктаза не является медьсодержащим ферментом, а у *Nurhomicobium* IV - возможно, является.

Накопление нитрата *Nurhomicobium* Z-3 в случаях, когда в среду не добавляли  $Cu^{2+}$  (рис.1Б), проще всего было объяснить тем, что нитритредуктаза этого штамма является медьсодержащей. Известно, что нитритредуктазы некоторых денитрификаторов содержат медь (Iwasaki et al., 1975; Miyata, Mori, 1969; Sawada et al., 1978; Kakutani et al., 1981). Однако клетки *Nurhomicobium* Z-3 после анаэробного культивирования с нитратом без добавления меди обладают достаточно высокой способностью к восстановлению нитрата. Тем не менее суспензия этих клеток накапливает нитрат при восстановлении нитрата. По-видимому, нитрат ингибирует активность нитритредуктазы в этих клетках. Механизмом ингибирования может являться конкуренция за электроны между нитратредуктазой и нитритредуктазой на уровне взаимодействия с ЭПЦ. Возможно, что при культивировании в присутствии меди синтезируется дополнительный содержащий медь переносчик электронов к нитритредуктазе, обладающий высоким сродством к ЭПЦ. Синтез этого переносчика повышает конкурентоспособность восстановления нитрата с восстановлением нитрата. Наличие двух переносчиков электронов к нитритредуктазе, один из которых содержит медь, известно для *Pseudomonas aeruginosa* (Yamada, 1964; Payne, 1981).

#### 5. Ингибирующее влияние нитрата на *Nurhomicobium* Z-3.

Поскольку добавление меди к среде культивирования *Nurhomicobium* Z-3 препятствует накоплению нитрата и значительно повышает урожай биомассы в расчете на перенесенные в ЭПЦ электроны, можно предположить, что нитрат снижает эффективность биоэнергетических процессов. Для проверки этого предположения и выяснения механизма действия нитрата мы решили определять, как влияет присутствие накапливаемого или экзогенно внесенного нитрата на урожай биомассы *Nurhomicobium* Z-3 (в расчете на использованный метанол) и на содержание в клетках белка и ПОМК (табл.2). В этом опыте культивирование *Nurhomicobium* Z-3 вели на среде 337 с начальной концентра-

цией метанола 0,16% v/v = 40 мМ, выбранной с расчетом, чтобы акцептор электронов находился в избытке, в следующих вариантах:

- 1) Анаэробно с 50 мМ  $\text{NO}_3^-$  с внесением 0,2 мМ  $\text{Ca}^{2+}$
- 2) Анаэробно с 50 мМ  $\text{NO}_3^-$  без внесения  $\text{Ca}^{2+}$
- 3) Аэробно с добавлением 50 мМ  $\text{NO}_2^-$
- 4) Аэробно без добавления  $\text{NO}_2^-$ .

Таблица 2  
Влияние нитрита на рост и состав биомассы *Nurhomicobium 2-3*

| Акцептор электронов   | : Наличие $\text{Ca}^{2+}$ (0,2 мМ) | : Наличие $\text{NO}_2^-$ мМ | $\mu$ , час <sup>-1</sup> | Конечные                                |                           |                          | Остаточные                    |                        |                        |
|-----------------------|-------------------------------------|------------------------------|---------------------------|---|---------------------------|--------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|
|                       |                                     |                              |                           | : Сухой вес, г/г $\text{CH}_3\text{OH}$ | : Белок, % от сухого веса | : ПОМК, % от сухого веса | : $\text{CH}_3\text{OH}$ , мМ | : $\text{NO}_3^-$ , мМ | : $\text{NO}_2^-$ , мМ |
| 50 мМ $\text{NO}_3^-$ | +                                   | -                            | 0,08                      | 0,34                                    | 68                        | 2                        | 0                             | 14                     | 4                      |
|                       |                                     |                              | 0,08                      | 0,32                                    | 68                        |                          | 0                             | 14                     | 4                      |
|                       | -                                   | -                            | 0,05                      | 0,20                                    | 48                        | 14                       | 0                             | 1                      | 29                     |
|                       |                                     |                              | 0,05                      | 0,19                                    | 44                        |                          | 0                             | 1                      | 33                     |
| $\text{O}_2$ воздуха  | +                                   | -                            | 0,075                     | 0,41                                    | 72                        | 2                        | 0                             | -                      | -                      |
|                       |                                     |                              | 0,075                     | 0,42                                    | 76                        |                          | 0                             | -                      | -                      |
|                       | +                                   | 50                           | 0,025                     | 0,34                                    | 45                        | 14                       | 0                             | -                      | 46                     |
|                       |                                     |                              | 0,025                     | 0,30                                    | 46                        |                          | 0                             | -                      | 48                     |

Снижение в присутствии нитрита урожая в расчете на использованный метанол, снижение содержания белка в клетках и накопление ПОМК, синтез которой требует меньше энергии, свидетельствует о том, что нитрит для *Nurhomicobium 2-3* является агентом, частично нарушающим сопряжение переноса электронов и фосфорилирования, подобно тому, как это имеет место у *Fe.denitrificans*, *Fe.aeruginosa* и *Fe.rutida* (Mejer et al., 1979; Rake, Kagou, 1980).

Для *Nurhomicobium 2-3* маловероятен механизм ингибирования, предполагающийся по косвенным данным для *Nurhomicobium X* (Meiberg et al., 1980) - ингибирование переноса электронов в ЭЦ, так как, если бы нитрит ингибировал перенос электронов в ЭЦ, неизбежно окисляя  $\text{Fe}^{2+}$  переносчиков, как это первоначально предполагалось для *Fe.aeruginosa* (Row et al., 1979), то он сам бы восстанавливался и удалялся бы из среды при аэробном культивирова-

нил, чего в наших опытах не наблюдалось. Если нитрат ингибировал бы перенос электронов в ЭТЦ каким-то иным образом, то, по-видимому, снижалась бы скорость роста, но не урожай.

6. Эффективность аэробного и анаэробного катаболизма метанола у *Nurhromicrobium Z-3* и *Nurhromicrobium ZV*.

Между штаммами *Nurhromicrobium Z-3* и *ZV* нами были обнаружены значительные различия в скорости роста и урожае при анаэробном развитии с нитратом, особенно в присутствии  $Cu^{2+}$  (рис. I). Это побудило нас сравнить скорости роста и урожай этих штаммов и при аэробном культивировании. В табл. 3 сопоставлены характеристики роста и состав биомассы *Nurhromicrobium Z-3* и *Nurhromicrobium ZV* после аэробного и анаэробного роста с начальной концентрацией метанола 0,16%  $v/v = 40$  мМ, выбранной с расчетом, чтобы акцептор электронов находился в избытке.

Таблица 3

Характеристика роста и состав биомассы *Nurhromicrobium Z-3* и *Nurhromicrobium ZV* при аэробном и анаэробном росте с 50 мМ  $NO_3^-$  в присутствии 0,2 мМ  $Cu^{2+}$

| Штамм | Акцептор электронов | $\mu$ , час <sup>-1</sup> | Конечные                |                         |                        | Остаточные    |               |               |
|-------|---------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|---------------|---------------|---------------|
|       |                     |                           | Сухой вес, г/г $CH_3OH$ | Белок, % от сухого веса | ПОМК, % от сухого веса | $OH_3OH$ , мМ | $NO_3^-$ , мМ | $NO_2^-$ , мМ |
| Z-3   | 50 мМ $NO_3^-$      | 0,08                      | 0,34                    | 68                      | 2                      | 0             | 14            | 4             |
|       |                     | 0,08                      | 0,32                    | 68                      |                        | 0             | 14            | 4             |
|       | $O_2$ воздуха       | 0,075                     | 0,41                    | 72                      | 2                      | 0             | -             | -             |
|       |                     | 0,075                     | 0,42                    | 76                      |                        | 0             | -             | -             |
| ZV    | 50 мМ $NO_3^-$      | 0,02                      | 0,12                    | 43                      | 28                     | 0             | -             | -             |
|       |                     | 0,03                      | 0,17                    | 50                      |                        | 0             | -             | -             |
|       | $O_2$ воздуха       | 0,085                     | 0,34                    | 54                      | 9                      | 0             | -             | -             |
|       |                     | 0,085                     | 0,27                    | 50                      |                        | 0             | -             | -             |

Аэробный рост штаммов *Nurhromicrobium Z-3* и *ZV* различается сравнительно мало. Анаэробное культивирование при внесении  $Cu^{2+}$  выявляет большие различия между этими штаммами в скорости и эффективности анаэробного роста с нитратом и метанолом.

*Nurhomicobium* ZV имеет низкую скорость и эффективность анаэробного роста с нитратом независимо от присутствия  $\text{Cu}^{2+}$ . При развитии в таких условиях накапливает в клетках значительное количество ПОМК.

*Nurhomicobium* Z-3 обладает высокой скоростью и эффективностью анаэробного роста с нитратом в присутствии  $\text{Cu}^{2+}$ . Состав биомассы в таких условиях характеризуется высоким содержанием белка и низким содержанием ПОМК. Урожай, скорость роста и состав биомассы этого штамма в аэробных и анаэробных условиях примерно одинаковы.

При аэробном культивировании бактерий и дрожжей на метаноле урожай у различных их представителей варьирует от 0,19 до 0,45 г сухой биомассы на 1 г метанола (Cooney, Levine, 1972), достигая у отдельных культур 0,5 г/г (van Dijken, Harder, 1975). По литературным данным, анаэробный рост денитрификаторов характеризуется меньшим урожаем, чем их аэробный рост (Koike, Hattori, 1975a; Steuthamer et al., 1982). Таким образом, исходя из литературных данных по урожаю бактерий и дрожжей на метаноле в аэробных условиях и по сравнительной эффективности кислородного дыхания и денитрификации, можно предположить, что *Nurhomicobium* Z-3 обладает предельно эффективным катаболизмом метанола при денитрификации.

В настоящее время во многих странах проводится поиск культур микроорганизмов, перспективных для получения кормового белка из метанола. Разрабатываются методы аэробного получения биомассы. При наличии штамма, дающего высокий урожай в анаэробных условиях, замена кислорода на нитрат может быть экономически выгодной.

7. Влияние аэрации на состав продуктов метилотрофной денитрификации.

Для денитрификации в почвах известно, что усиление аэрации снижает скорость процесса и повышает отношение  $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ . Физиолого-биохимический механизм повышения отношения  $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$  не изучен. Это явление может быть объяснено тем, что  $\text{N}_2\text{O}$ -редуктаза из всех ферментов денитрификации наиболее чувствительна или 1) к ингибированию аэрацией активности фермента, или 2) к репрессии аэрацией его синтеза.

Мы исследовали влияние аэрации на активность ферментов денитрификации у *Nurhomicobium* Z-3 и на синтез ферментов денитрификации у *Nurhomicobium* Z-3 и *Nurhomicobium* ZV. Ферменты денитри-



фиксации последовались в данном случае по способности суспензий клеток восстанавливать  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{H}_2\text{O}$  за счет метанола.

Влияние аэрации на активность ферментов денитрификации оценивали, инкубируя одновременно с нитратом (или  $\text{H}_2\text{O}$ ) и кислородом суспензии клеток *Nitrosomonas* 2-3, собранных после анаэробного роста с нитратом. Суспензии в таких опытах инкубировали в ферментере "Biotek" с кислородным электродом при интенсивном перемешивании. Кислород вводили в газовую фазу (инертный газ или  $\text{H}_2\text{O}$ ) в начале опыта.

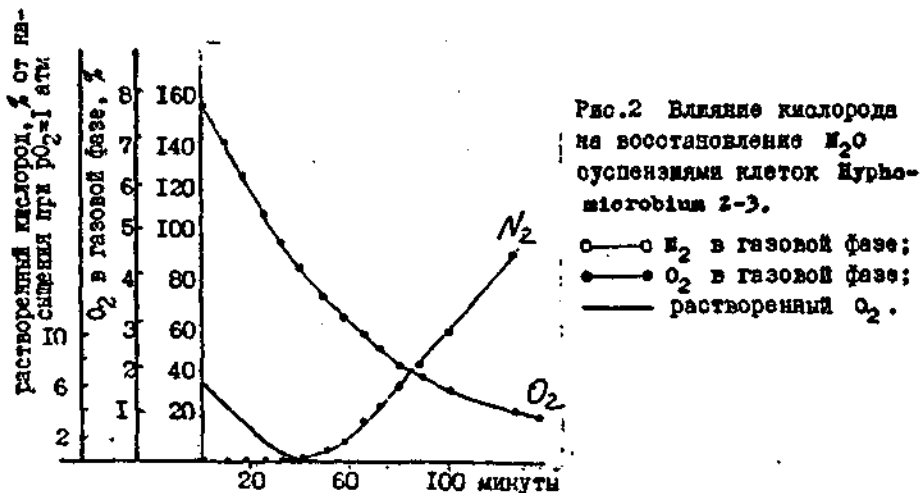


Рис. 2 Влияние кислорода на восстановление  $\text{H}_2\text{O}$  суспензиями клеток *Nitrosomonas* 2-3.

○ —  $\text{N}_2$  в газовой фазе;  
● —  $\text{O}_2$  в газовой фазе;  
— растворенный  $\text{O}_2$ .

На рис. 2 представлено влияние  $\text{O}_2$  на восстановление  $\text{H}_2\text{O}$  клетками *Nitrosomonas* 2-3. Вначале клетки восстанавливают только  $\text{O}_2$ . Медленное восстановление  $\text{H}_2\text{O}$  начинается лишь после снижения концентраций растворенного кислорода. По изменению скорости поглощения  $\text{O}_2$  в это время можно сделать вывод о том, что эта концентрация примерно равна 1-2  $K_m$  пиктохромоксидазы. При дальнейшем снижении концентрации растворенного  $\text{O}_2$  скорость восстановления  $\text{H}_2\text{O}$  становится максимальной.

Несмотря на ингибирующее влияние кислорода на  $\text{H}_2\text{O}$ -редуктазу *Nitrosomonas* 2-3, мы не обнаружили образования закиси азота из нитрата суспензиями клеток этого штамма в присутствии различных концентраций растворенного кислорода. Денитрификации либо не про-

исходило, либо образовывался только  $H_2$ . Таким образом, у *Nurhomicobium* Z-3 активность  $H_2O$ -редуктазы ингибируется аэрацией не сильнее, чем активность других ферментов денитрификации. Действие аэрации на активность ферментов денитрификации у этого организма не приводит к образованию  $H_2O$  из  $NO_3^-$ .

Чтобы выяснить влияние аэрации на синтез ферментов денитрификации, клетки собирали после аэробного роста и инкубировали в анаэробных условиях с нитратом, нитритом или  $H_2O$ . Для сравнения исследовали клетки, выращенные анаэробно с нитратом или  $H_2O$ .

В клетках *Nurhomicobium* Z-3 на экспоненциальной фазе аэробного роста активность всех ферментов денитрификации весьма низка. Однако вскоре после наступления линейной фазы роста в клетках обнаруживается достаточно высокая активность нитрат- и нитритредуктаз, но не  $H_2O$ -редуктазы (табл.4).

Клетки *Nurhomicobium* ZV после аэробного линейного роста также имели высокую активность нитрат- и нитритредуктаз и низкую активность  $H_2O$ -редуктазы (табл.4).

Таблица 4

Влияние условий культивирования на ферменты денитрификации

| Организм                 | Условия культивирования | Восстановление акцепторов в суспензиях, помещенных в анаэробные условия -I |          |        |
|--------------------------|-------------------------|--|----------|--------|
|                          |                         | $NO_3^-$   | $NO_2^-$ | $H_2O$ |
| <i>Nurhomicobium</i> Z-3 | анаэробно с $NO_3^-$    | 3,5  | 3,3      | 5,0    |
|                          | анаэробно с $H_2O$      | 1,3  | 0,8      | 4,0    |
|                          | аэробно (линейный рост) | 1,0  | 0,14     | 0,02   |
| <i>Nurhomicobium</i> ZV  | аэробно (линейный рост) | 1,0  | 1,0      | 0,006  |

Таким образом, допрепрессия синтеза нитрат- и нитритредуктаз *Nurhomicobium* Z-3 и *Nurhomicobium* ZV наступает в линейной фазе роста, то есть в условиях, когда концентрация растворенного кислорода начинает лимитировать скорость роста.

Ингибирующее влияние кислорода на ферменты денитрификации у *Nurhomicobium* Z-3 снимается также при снижении концентрации

растворенного кислороде до значений, близких к  $K_m$  пиягхромоксидазы по  $O_2$  (рис.2).

Эти данные согласуются с предположением (Stouthamer, 1976), что ферменты денитрификации регулирует не кислород сам по себе, а значение, которое он оказывает на степень восстановленности переносчиков ЭТЦ, и что активность и синтез ферментов денитрификации регулируется координированно.

В то же время исключительно высокая чувствительность синтеза (но не активности)  $N_2O$ -редуктазы *Nurhromicrobium* Z-3 к аэрации противоречит этой простой модели.

8. Образование закиси и окиси азота при переходе от аэробно-за к анаэробно-за.

Суспензии клеток *Nurhromicrobium* ZV, собранных после аэробного линейного роста образуют из нитрата лишь  $N_2O$  (рис.3).

Суспензии клеток *Nurhromicrobium* Z-3, собранных после аэробного линейного роста, при анаэробной инкубации с нитратом образуют, помимо  $N_2$ , закись и окись азота (рис.4). Промежуточным продуктом является нитрит. Образование закиси азота особенно заметно при длительной инкубации. Через 20 часов около половины азота нитрата складывается в составе  $N_2O$  (рис.4Б). Напротив, суспензии клеток *Nurhromicrobium* Z-3, выращенных анаэробно с нитратом, не образуют в анаэробных условиях газообразных продуктов иных, чем  $N_2$ .

Таким образом, основным газообразным продуктом денитрификации у *Nurhromicrobium* Z-3 и у *Nurhromicrobium* ZV при переходе от аэробно-за к анаэробно-за является закись азота. Механизмом является большая чувствительность синтеза  $N_2O$ -редуктазы к репрессии аэрацией по сравнению с синтезом других ферментов денитрификации.

Полученные данные могут иметь определенное значение для практики. Существующие технологические проекты очистных сооружений предусматривают после анаэробного танка аэробный для удаления избыточного метанола, причем отстойник между ними не предусматривается, а избыточная биомасса из последнего аэробного танка возвращается в анаэробный танк. Наши данные показывают, что в случае образования нежелательных газообразных продуктов причину можно искать в переходных процессах, которым подвергаются метилотрофные денитрификаторы при такой технологии.

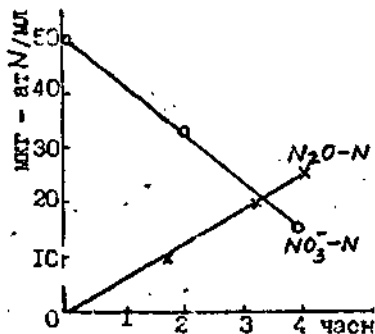


Рис.3 Восстановление нитрата клетками *Cupressinicrobium ZV*, выращенными аэробно.

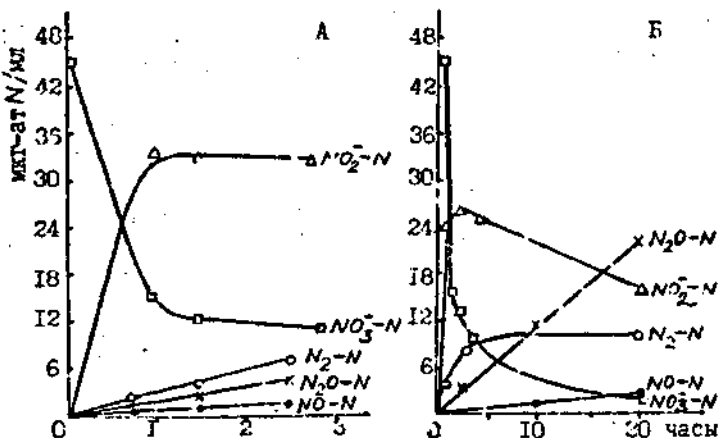


Рис.4 Восстановление нитрата клетками *Cupressinicrobium Z-3*, выращенными аэробно

### 9. Перенос электронов от метанола к нитрату у *Cupressinicrobium Z-3*.

Для *Fe-denitrification* предложена следующая схема переноса электронов при денитрификации за счет метанола (Wanforth, Squzie, 1978b):



Эта схема экстраполируется и на гифомикробов (Large et al., 1979; Weiberg, 1979). Согласно схеме, электроны к нитрату могут быть перенесены от формата и формальдегида, но не от метанола (от него они могут быть перенесены к  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ).

Расчет показывает, что даже при условии наличия НАД-зависимой формальдегиддегидрогеназы схема не допускает накопления нитрита в количестве, превышающем 2/3 восстановленного нитрата. Учет ассимиляции формальдегида делает эту цифру еще меньше. Однако нами обнаружено, что *Nurhomicobium* 2-3 при анаэробном росте с нитратом и метанолом в отсутствие ионов  $\text{Cu}^{2+}$  накапливает нитрит в количестве, составляющем 60-90% от восстановленного нитрата. Более того, после аэробного линейного роста в отсутствие  $\text{Cu}^{2+}$  клетки *Nurhomicobium* 2-3, переведенные в анаэробные условия, почти стехиометрически восстанавливают нитрат в нитрит за счет метанола. Скорость восстановления за счет эндогенных субстратов много выше.

Одним из объяснений наблюдаемого явления могло бы быть наличие у *Nurhomicobium* 2-3 необычной метанолдегидрогеназы или нитратредуктазы, которые реагировали бы с ЭЦ в иных участках, чем указаны на принятой схеме.

Мы исследовали свойства нитратредуктазы и метанолдегидрогеназы в экстрактах клеток аэробно выращенной культуры *Nurhomicobium* 2-3, обладавшей указанным свойством почти стехиометрически восстанавливать нитрат в нитрит за счет метанола после перехода в анаэробные условия. Полученные данные свидетельствуют о наличии обычной диссеминированной нитратредуктазы и стандартной бактериальной метанолдегидрогеназы. Кроме того, нами получены спектры целых клеток *Nurhomicobium* 2-3, показывающие окисление цитохрома b, но не цитохрома c, нитратом и восстановление цитохрома c, а не b.

этанолом, являющемся одним из субстратов метанодегидрогеназы.

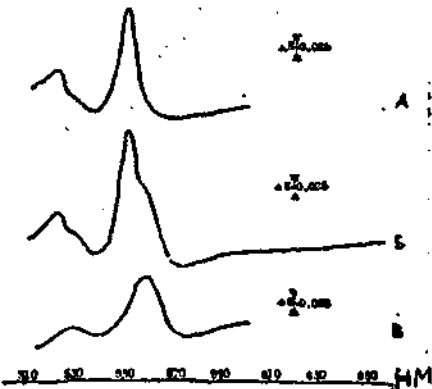


Рис.5 Восстановление цитохрома с этанолом и окисление цитохрома в нитратом в клетках *Nitrosomonas* 2-3.

Дифференциальные спектры:

- А.  $C_2H_5OH$  - без добавок;  
Б.  $C_2H_5OH$  + - без добавок;  
+ дитионит  
В. дитионит - дитионит +  
+  $O_3$ .

Таким образом, наблюдаемый процесс восстановления нитрата в нитрит за счет метанола клетками *Nitrosomonas* 2-3 осуществляется с участием обычных ферментов и происходит с переносом электронов от цитохрома с к цитохрому в. Такая возможность не учитывается в литературе по ЭПЦ металлотрофных денитрификаторов.

Приведенные на рис.5 спектры дают основания полагать, что перенос электронов от цитохрома в к цитохрому с, происходящий при восстановлении нитрата в нитрит за счет метанола, идет против градиента окислительно-восстановительного потенциала. Если бы цитохром в, передающий электроны на нитратредуктазу, имел бы потенциал больший или равный потенциалу цитохрома с, принимающего электроны от метанодегидрогеназы, то цитохром в должен был бы восстанавливаться в присутствии метанола, а цитохром с окисляться в присутствии нитрата. По-видимому, перенос электронов против градиента окислительно-восстановительного потенциала происходит за счет того, что при одновременном присутствии метанола и нитрата цитохром в все время находится в окисленном, а цитохром с - в восстановленном состоянии, и реакция становится термодинамически законсервированной.

10. О возможности использования способности к денитрификации в качестве видовой признаки у гифомакробов.

Род *Nurhomicrobium* изучен недостаточно. Систематика его на видовом уровне в настоящее время отсутствует. Возникает вопрос, нельзя ли считать способность части представителей рода к денитрификации видовым признаком?

Как показали Аттууд и Хардер (Attwood, Harder, 1972), и подтверждают наши результаты, гифомикробы, способные к денитрификации, легко выделяются из различных естественных местобитаний. В то же время нами показана неспособность к денитрификации ряда штаммов, выделенных в аэробных условиях. Наши опыты с накопительными культурами нитрификаторов показали, что гифомикробы, неспособные к денитрификации, могут обнаруживаться в условиях благоприятствующих процессу. Таким образом, группы гифомикробов-денитрификаторов и неденитрификаторов, по-видимому, оравнены по мощности и с этой точки зрения разделены рода по признаку способности к денитрификации могло бы быть возможным. Однако наше исследование физиологии денитрификации у гифомикробов показало, что штаммы гифомикробов резко различаются по скорости и эффективности использования метанола при денитрификации, составу накапливаемых промежуточных продуктов, по способности к росту с закисью азота, по потребности в ионах меди.

Различия в физиологии денитрификации у гифомикробов скорее всего имеет под собой энзимологическое обоснование, что позволяет предположить, что ферменты денитрификации появились независимо в двух или более группах гифомикробов.

Считается, что при денитрификации за счет метанола необходима "точно сбалансированная" работа ЭПЦ (см. стр. 18). Если бы это было так, то неоднократное эволюционное возникновение способности к денитрификации с метанолом у гифомикробов выглядело бы маловероятным. Казалось бы, о том же говорит и устойчивое представление о узости круга организмов, способных к денитрификации с метанолом.

Наши данные, полученные с *Nurhomicrobium Z-3*, показывают, что особой сбалансированности работы ЭПЦ при денитрификации с метанолом не требуется. Возможен перенос электронов от цитохрома с, восстанавливаемого метанолом, к цитохрому b, окисляемому нитратом. Выделение штамма Z-100, способного к денитрификации с метанолом и не похожего на гифомикробов и *Pc. denitrificans*, показывает, что круг метилотрофных денитрификаторов шире, чем считалось. Этот факт

также говорит о том, что неоднократное возникновение способности к денитрификации с метанолом, в том числе внутри рода *Nurhomicobium*, вполне возможно.

Таким образом, полученные нами данные позволяют утверждать, что разделение рода *Nurhomicobium* по признаку способности к денитрификации нецелесообразно.

## ВЫВОДЫ

1. Способность к денитрификации за счет метанола обнаруживается не у всех штаммов гафомикробов.

Гафомикробы, способные к денитрификации с метанолом, представляют собой гетерогенную группу. Они различаются по скорости роста и эффективности использования метанола при денитрификации, остатку накапливаемых промежуточных продуктов восстановления нитрата, по способности к росту с закисью азота.

2. Метилотрофная денитрификация даже в строго анаэробных условиях и при нейтральном pH может сопровождаться накоплением промежуточных продуктов - нитрита и закиси азота, причем их состав различен у разных штаммов.

Присутствие ионов меди ( $0,1-20 \text{ мкМ}$ ) предотвращает накопление как  $\text{NO}_2^-$ , так и  $\text{N}_2\text{O}$ . Единственным продуктом метилотрофной денитрификации становится  $\text{N}_2$ .

3. Чередование аэробных и анаэробных условий при метилотрофной денитрификации ведет к образованию закиси азота, что объясняется тем, что синтез  $\text{N}_2\text{O}$ -редуктазы репрессирована при значительно более низких концентрациях растворенного кислорода, чем синтез других редуктаз денитрификации.

При переходе метилотрофных денитрификаторов от аэробных условий к анаэробным может образовываться также окись азота.

4. У штамма *Nurhomicobium* 2-3 может происходить перенос электронов от метанолдегидрогеназы к нитратредуктазе, что противоречит принятым представлениям о функционировании ЭЦП метилотрофных денитрификаторов.

5. Выделение бактериального штамма, отличающегося от *Nurhomicobium* и *Paracoccus denitrificans* и способного к денитрифика-



ция с метанолом, показывает, что круг организмов, способных к осуществлению этого процесса, не столь узок, как считалось ранее.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Лебединский А.В. Рост *Nurohomiostridium* с различными акцепторами электронов. - Микробиология, 1981, т.50, № 4, с.665-669.

2. Лебединский А.В., Веденина И.Я. Образование закиси и окиси азота метилотрофными денитрификаторами. - Микробиология, 1981, т.50, № 5, с.757-762.

3. Веденина И.Я., Лебединский А.В. Влияние меди на состав продуктов денитрификации у гифомикробов. - Микробиология, 1983, т.52, № 6, с.917-923.

4. Лебединский А.В., Головачева Р.С. Термофильный *Nurohomiostridium*. - В сб.: Термофильные микроорганизмы в природе и практике народного хозяйства. Тез.докл., Москва, 1983, с.57.

5. Лебединский А.В. Метилотрофная денитрификация как метод очистки сточных вод от нитратов. - В сб.: Биология культивирования и использования микроорганизмов в народном хозяйстве. Тез. докл., Ташкент, 1983, с.45.

6. Веденина И.Я., Лебединский А.В. Превращение закиси азота при денитрификации, диссимиляционном образовании аммония и нитрификации. - Успехи микробиологии, 1984, т.19, с.135-165.

---

Т-04308. Подписано к печати 16.05.84г. Заказ № 112. Тираж 150 экз.

Бюро множительной техники Института полиомеелита АМН СССР.

