

Изучение физиологических групп микроорганизмов метанооксиляющих сообществ

Бабусенко Е.С., Лалова М.В.*, Нюньков П.А., Цымбал В.В.

ООО «Гипробиосинтез», Москва, Россия

* lalova.m@gibios.ru

Ключевые слова: сообщества метанооксиляющих бактерий; экологические стратегии; мультисубстратное тестирование

Метанооксиляющие бактерии (метанотрофы) – уникальная группа бактерий, отличающаяся способностью использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии. Эти бактерии рассматриваются как перспективный объект для экологически чистого производства микробной биомассы на природном газе с целью получения кормовых добавок, для выделения из биомассы биологически активных соединений.

В природной среде метанотрофы склонны образовывать сложные ассоциации с другими бактериями. В состав таких ассоциаций, помимо, метанооксиляющих бактерий, входят одна или более синтрофных культур, потребляющих либо продукты метаболизма данных бактерий, либо продукты, образующиеся в результате работы основного фермента метанмонооксигеназы. Такие сообщества позволяют более полно ассимилировать газообразные субстраты, находящиеся в природном газе, что предотвращает ингибирование ими основного продуцента и, следовательно, обеспечивает стабильность и эффективность всего сообщества. Однако в условиях незащищенной ферментации самопроизвольно формируются смешанные культуры, состоящие из основного производственного штамма и сопутствующей микрофлоры.

Изучение состава природных сообществ, их трофических связей, характера взаимоотношений между видами в биоценозе, является основой для разработки технологических приемов и способов сохранения устойчивости смешанных культур.

Из объектов окружающей среды уже выделено значительное количество метанооксиляющих бактерий, однако число высокопродуктивных культур, использование которых экономически целесообразно, невелико.

Цель: поиск новых метанооксиляющих бактерий и их сообществ, способных потреблять метан из природного газа с удовлетворительным выходом биомассы. Были проведены работы по выделению метанооксиляющих бактерий из природных образцов, отобранных на Южно-Кисловском месторождении. Использовали конденсат газовый стабильный (КГС), газовый конденсат нестабильный (КГН), почву, отобранную на площадке, расположенной на удалении 0.5 км от газоносной скважины (ПГС).

Выделение метанооксиляющих бактерий проводили, используя метод накопительных культур.

Для получения накопительных культур использовали минеральную среду «П» [1]. Образцы проб были отобраны с глубины скважины газового месторождения, имеющей температурный фон 55 °С.

Выделение метанотрофов проводили при температуре: 55, 50, 45, 40, 30 °С. В колбы объемом 1000 мл вносили 200 мл минеральной среды и 30 мл природного образца. Засеянные колбы параллельно заполняли либо чистым метаном (99.9 %), либо природным газом (содержание метана не менее 96 %), затем инкубировали на качалке при 220 об/мин.

После первых трех пассажах при температурах 30, 40 и 45 °С в образцах КГС и КГН наблюдалось незначительное помутнение среды при росте на чистом метане. Но при последующих пересевах роста не было. На природном газе признаки роста отсутствовали при инкубировании при всех указанных температурах.

При использовании природного газа в образце ПГС был отмечен стабильный рост при температурах 30 и 45 °С, причем на природном газе рост был более интенсивный, чем на чистом метане. Для каждой температуры было проведено 12 пассажей по 5 суток каждый.

На 5–7-е сутки в колбах появлялся заметный диффузный или хлопьевидный рост. Как правило, метаноокисляющие культуры являют собой ассоциацию метанотрофных и сопутствующих микроорганизмов. В первичных накопительных культурах может присутствовать несколько (2–3) видов метанотрофов и до 7–8 бактериальных спутников, окисляющих метанол и другие продукты соокисления гомологов метана, а также использующих продукты метаболизма метанотрофа [1]. При микроскопировании суспензии (I), полученной при 30 °С, наблюдали значительное разнообразие бактериальной микрофлоры. Наряду с преобладанием кокков и диплококков присутствовали палочковидные бактерии различных размеров. В суспензии, полученной при 40 °С (II), микробное разнообразие было меньше.

Структура ассоциации микроорганизмов и ее физиологические параметры изменяются во времени и пространстве, подвержены значительному влиянию различных факторов окружающей среды.

Для понимания структуры микробного сообщества, характера взаимодействия отдельных видов микроорганизмов, входящих в состав сообщества необходимо исследовать таксономическое и функциональное разнообразие данной ассоциации микроорганизмов.

Традиционные методы применения селективных питательных сред позволяют учитывать численность микроорганизмов лишь на первых этапах сукцессии, когда велико разнообразие микроорганизмов в системе. Кроме того, таксономический состав микроорганизмов, представляющих ту или иную группу микроорганизмов, непостоянен и изменяется в зависимости от конкретных условий. Поэтому физиологические группы, выявляемые на определенных селективных средах, совсем не обязательно осуществляют те же процессы в производственных условиях.

Существуют более прогрессивные методы, например, метод анализа спектра потребления органических субстратов (СПС) природной ассоциацией [2]. Разработаны модификации этого метода [3], которые позволяют определить не только спектр используемых микроорганизмами субстратов, но и дать количественную оценку потребления каждого из них.

Устойчивость тех или иных физиолого-биохимических функций ассоциативных микроорганизмов при изменении физико-химических параметров обусловлена наличием нескольких дублирующих друг друга видов микроорганизмов, с одной стороны, и их адаптацией к новым условиям – с другой [4].

Для характеристики функционального разнообразия микробного сообщества был апробирован метод мультисубстратного тестирования (МСТ), который был выполнен в соответствии со стандартной методикой [3]. При проведении анализа оценивали спектры потребления субстратов микробными сообществами I и II. В работе использовали стандартные 48-луночные планшеты с 11 источниками органического углерода (альдегиды, спирты, органические кислоты, углеводы). Две ячейки были контрольными. Данные планшеты с субстратами были приготовлены на кафедре биологии почв факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова. Планшеты инкубировали в термостате в течение 3-х суток при температуре 28 °С до появления визуально регистрируемой окраски ячеек. При росте микроорганизмов, потребляющих субстрат, в ячейках происходило восстановление неокрашенных солей тетразолия до бордово-окрашенного формазана. По завершении инкубации проводили фотометрическое считывание оптической плотности ячеек при длине волны 510 нм.

При обработке результатов МСТ оценивали количество используемых субстратов и интенсивность их потребления. Установлено, что существуют количественные и качественные различия в ассимиляции субстратов. Так, микробное сообщество I (выделенное при температуре 30 °С) ассимилировало 9 субстратов (метанол, этанол, бутанол, ацетат, формальдегид, глюкозу, галактозу, арабинозу, фруктозу), а микробное сообщество II (выделенное при 45 °С) – 4 субстрата (этанол, формальдегид, ацетат, глюкозу).

Таким образом, получены два микробных метанооксиляющих сообщества, которые можно рассматривать, как перспективные объекты для промышленного получения кормовой добавки на основе метанооксиляющих бактерий. Следующий этап работы предполагает выделение из полученных сообществ чистых культур, их идентификацию и изучение физиолого-биохимических свойств.

Список литературы/References

1. Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии. М.: ГЕОС, 2001
2. Garland J.L. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 1997;24:289-300. doi 10.1111/j.1574-6941. 1997.tb00446.x
3. Горленко М.В., Кожевин П.А. Мультисубстратное тестирование природных микробных сообществ. М.: МАКС Пресс, 2005
4. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1987