Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН
Московская Гимназия на Юго-Западе №1543

Переописание вида анаэробных гидрогеногенных карбоксидотрофных прокариот *Carboxydocella thermautotrophica*

Поляков Павел Сергеевич

Научный руководитель:
д.б.н. Соколова Татьяна Геннадьевна

Москва 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

Часть 1: Введение **2**

1.1. Актуальность проблемы 2

1.2. Цели и задачи работы 2

Часть 2: Обзор литературы **3**

2.1. Термофилы 3

2.2. Гидротермы 4

2.3. Систематика в микробиологии 6

2.4. род *Carboxydocella* 8

Часть 3: Материалы и методы **13**

3.1. Культивирование объектов 13

3.2. Идентификация отдельных штаммов 16

3.3. Оценка численности объектов в образце 17

3.4. Проверка потребляемости объектами субстрата 17

3.4.1. Хроматография 18

Часть 4: Результаты исследования **19**

4.1. Исправленное описание вида *Carboxydocella thermoautotrophica* 22

Часть 5: Благодарности **22**

Часть 6: Список литературы **23**

ЧАСТЬ 1: ВВЕДЕНИЕ

1.1. Актуальность проблемы.

Уже более ста лет человеку известны термофилы – микроорганизмы, обитающие в местообитаниях с повышенной температурой (гидротермы), однако их более подробное изучение началось лишь недавно. Наибольший интерес для биотехнологии в этих микроорганизмах вызывают их белки, способные сохранять свои структуру и функции в экстремальных для других условиях повышенной температуры. Кроме того, гидротермы по своему химическому составу и другим свойствам несколько напоминают условия на Земле в период возникновения жизни на ней, поэтому изучение их обитателей может помочь получить ответы на некоторые вопросы,связанные с появлением жизни.

Среди анаэробных термофильных гидрогеногенных прокариот был описан род *Carboxydocella* (sokolova et al, 2002). Первым видом, выделенным в чистую культуру, был *C. thermautotrophica* (штамм 41). Этот вид оказался облигатным карбоксидотрофом, т.е. он не рос на других субстратах. Впоследствии были выделены другие виды этого рода в том числе "*C. ferrireducens*" (штамм 019). Фенотипически эти штаммы значительно различались. До исследования геномов ученые предполагали, что эти штаммы принадлежат к разным видам рода *Carboxydocella*. Геномные исследования показали высокое сходство геномов штаммов 41 и 019, различия между геномами составляли лишь 10 %, что означает их принадлежность к одному виду. *C. thermautotrophica* был описан первым и, по существующим правилам, название должно быть сохранено. Целью этой работы было уточнение описания вида *C. thermautotrophica*.

Весьма важную роль в изучении микроорганизмов играет их классифицирование. Изучая филогенетические отношения между различными организмами, можно установить близкие родственные группы. Хотя на сегодняшний день не существует официальной классификации, большинство ученых опирается на классификацию, основанную на анализе генома и фенотипа.

1.2. Цели и задачи работы.

Целью представленной работы является физиологическое описание новых термофильных прокариот, использующих CO для получения энергии для роста (переописание вида *Carboxydocella* thermoautotrophica, описание нового вида рода *Carboxydocella*).

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

(1)Научиться анаэробной технике культивирования изучаемых видов (освоить методы приготовления сред и газовых смесей, пригодных для конкретных объектов, отработать технику пересева данных бактерий, а также научитьсявыделять чистые культуры;

(2)Освоить хроматографический и другие методы определения состава газов и сред для точной проверки результатов поставленных экспериментов;

(3)Следить за ростом изучаемых организмов на различных субстратах по численности клеток;

ЧАСТЬ 2: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Термофилы.

Микроорганизмы, живущие в местообитаниях с относительно высокой температурой – термофилы – известны более ста лет (Savage et al., 1987), однако особенно активно их начали изучать только в последние десятилетия. Такие микроорганизмы являются одними из старейших на Земле. Их местообитания – гидротермы – по содержанию компонентов и температуре близки к условиям на Земле в период возникновения на ней жизни, поэтому современные сообщества гидротерм, возможно, являются аналогами древнейших биоценозов (Заварзин, 1984), поэтому их изучение может привнести ясность в проблему возникновения и развития жизни на Земле. Кроме того, термофилы обладают белками необычного строения – их ферменты сохраняют свою структуру и высокую активность в экстремальных для других видов условиях (повышенная температура), что делает их привлекательными для биотехнологии. Главным преимуществом таких ферментов является как правило

высокая скорость процессов, проходящих при высоких температурах (при них, в свою очередь, проще контролировать чистоту процесса).

2.2. Гидротермы.

Гидротермы, или геотермальные источники, – природная экологическая ниша термофилов.

Такие местообитания возникают в результате конвекции (вид теплопередачи, при котором энергия передается струями и потоками), когда вода с поверххности Земли просачивается в глубь и нагревается при соприкосновении с глубинными породами, которые, в свою очередь, нагревает магма. Там нагретая вода с поверхности смешивается с ювенильными водами (глубинные воды, образуемые из кислорода и водорода, выделяемыми остывающей магмой). Находясь в прогретых породах, вода частично растворяет их и насыщается ювенильными газами, такими как O_2, N_2, CO_2, H_2S, H_2, CH_4, CO, а также солями Fe^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}, сульфатами и карбонатами (The Prokarotes V.1, 2006). При этом подобные источники практически не зависят от внешних погодных условиях и характеризуются относительным постоянством физико-химических условий – температура, pH и др. Гидротермы приурочены к зонам вулканизма и тектонической активности как на суше, так и в Мировом океане.

Наземные геотермальные источники делятся на три типа и различаются большим разнообразием pH, температур и состава флюидов:

Фумаролы Сольфатары Мофеты

Фумаролы – горячие (до 300°C) выходы воды или пара, обычно кислого, реже сульфатного или хлоридного состава.

Сольфатары – гидротермы, характеризующиеся большим содержанием как элементной серы, так и сульфатов, а также кислой реакцией среды.

Мофеты – наименее горячие выходы газа, содержащие преимущественно CO_2.

Очаги разгрузки глубоководных океанских гидротерм представляют собой «белые» и «черные» курильщики с температурой гидротермального флюида порядка 350ºC (Spiess, 1980). На устьях этих «курильщиков» в зоне смешения

восходящих горячих струй и холодной океанической воды образуются минеральные образования в виде полых построек – трубок, значительных по своим размерам – до нескольких метров в высоту. Минеральные скопления в устьях жерл «белых курильщиков» представлены в основном кремнеземом, баритом и пиритом (Spiess, 1980). «Черные курильщики» состоят в основном из сульфидных минералов (пирит, пирротин, сфалерит и др.).

Гидротермы характеризуются относительным постоянством физико-химических условий. В таких условиях возможно формирование устойчивых микробных сообществ, что и происходит. Устойчивость сообщества определяется балансом процессов продукции и деструкции (Заварзин, 1993). В наземных гидротермах при pH (кислотность среды, значения противоположны по знаку и равны по модулю логарифму активности протонов, выраженной в моль на литр) от 5 до 10 и температуре до 70°C развиваются сообщества, основанные на фототрофных организмах, объединенных в особые структуры – цианобактериальные маты. При более высоких температурах и в отсутствие света, как в глубоководных гидротермах, основу сообщества составляют хемолитоавтотрофные микроорганизмы (Schlegel, Jannasch , Гебрук, 2002).

Метаболизм хемолитотрофных прокариот основан на окислительно-восстановительных реакциях с участием присутствующих в гидротермах разнообразных доноров электронов – субстратов (H_2S, H_2, CH_4, CO, Fe^{2+}) и акцепторов (SO_4^{2-}, S0, CO_2, NO_3^-, O_2, MnO_4^-).

Главные литотрофные процессы в гидротермах хорошо изучены. Это:

–метаногенез

–сульфатредукция

–ацетогенез

–восстановление $Fe(OH)_3$

Основным источником электронов в микробных сообществах гидротерм является водород. Метаногены окисляют водород с одновременным восстановлением углекислоты в метан:

$$CO_2 + 4H_2 = CH_4 + 2H_2O \qquad \Delta G° = -131 \text{ кДж/моль}$$

Сульфатредуцирующие бактерии используют реакцию восстановления сульфатов:

$$SO_4^{2-} + 4H_2 + H^+ = HS^- + 4H_2O \qquad \Delta G° = -152{,}2 \text{ кДж/моль}$$

Ацетогены могут расти гетеротрофно или за счет окисления водорода :

$$2H_2 + CO_2 = CH_3COOH$$

Термофильные прокариоты, обитающие в гидротермах, могут использовать для получения энергии восстановление соединений трехвалентного железа:

$$2Fe^{3+} + H_2 = 2Fe^{2+} + 2H^+ \qquad \Delta G° = -228{,}3 \text{ кДж/моль}$$

Источником водорода в гидротермах являются как глубинные (вулканические) эксгаляции, так и деятельность некоторых микроорганизмов , таких как деструкторов органического вещества. Водород образуется также хемотрофными микроорганизмами. Относительно недавно были открыты термофильные организмы, образующие водород в результате реакции оксида углерода с водой:

$$CO + H_2O = CO_2 + H_2 \qquad \Delta G° = -20 \text{ кДж/моль}$$

Этот процесс получил название гидрогеногенной карбоксидотрофии. Такие микроорганизмы были обнаружены в разнообразных наземных и глубоководных гидротермах. Среди них есть представители многих родов бактерий и даже гипертермофильные археи.

Не так давно, в 2010г., в глубоководных гидротермах были обнаружены микроорганизмы способные получать энергию для роста за счет реакции формиата с водой, также сопровождающейя выделением водорода:

$$HCOOH + H_2O = CO_2 + H_2 \qquad \Delta G = +1.3 \text{ кДж/моль}$$

2.3. Систематика в микробиолгии.

Классификация микроорганизмов является очень динамичным разделом биологии, как и систематика в целом. Большинство изменений в иерархической классификации прокариот в последние десятилетия напрямую связаны с развитием молекулярной биологии и, как следствие, широкое использование

молекулярных методов в таксономических исследованиях (в первую очередь секвенирование 16S рРНК).

Занимаясь классификацией, ученые ставят перед собой задачу упорядочить большое число биологических объектов в систему формальных групп (таксонов) на основании принципов подобия и эволюционной связанности. Благодаря достижениям в области молекулярной биологии в 70-х годах удалось начать разработку методов классификации, основанных на сравнении геномов, и уже в 1987 году Международный комитет по систематике прокариот (далее МКСП) определил, что надежнейшим для классификации прокариот является филогения, и она должна определять их таксономию.

Современное направление таксономии прокариот называется таксономией согласия (полифазной таксономией). Она учитывает следующие критерии при классификации:

-филогенетические

-генетические

-хемотаксономические

-фенотипические.

В качестве филогенетических маркеров эволюции прокариот, дающих возможность относительное время разветвления групп организмов, приянто использовать последовательности генов 16S рРНК и 16S рДНК. На их основании построена современная иерархическая классификация.

Базовой единицей классификации в биологии является вид. Однако на данный момент у ученых нет согласия по вопросу определения видов у прокариот. Эксперты МКСП сформулировали компромиссные рабочие определения прокариотического вида, как базовой единицы классификации и идентификации. Последнее определение было представлено в 2002 г. в сообщении специального комитета по пересмотру определения вида в бактериологии.

Экспертами МКСП рекомендованы формальные границы прокариотического вида. Если расхождение в последовательностях 16S рРНК (16S рДНК) более 1%, то бактерии принадлежат к разным видам. Если же

процент гомологии более 99, помещение изолятов в один или два разных вида устанавливается по результатам ДНК-ДНК гибридизации (соединение комплементарных нитей ДНК двух разных организмов). К одному виду, как правило, относят штаммы, показывающие не менее 70% подобия ДНК с ДНК типового штамма, определяемого в строго стандартизированных условиях.

Фенотипические признаки при описании прокариот настолько же важны, насколько и молекулярные.

При этом не существует такого понятия как «официальная классификация» и любой биолог имеет право использовть любое существующее законно опубликованное название, согласно более правильной с его точки зрения классификации. Однако большинство придерживается классификации, приводимой в Руководстве (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology).

2.4. Род *Carboxydocella*.

Род *Carboxydocella* является родом анаэробных карбоксидотрофных (CO-потребляющих) гидрогеногенных прокариот. Этот род относится к типу Firmicutes. Ранее этот род относили к семейству Syntrophomonadaceae, однако последние исследования показали, что на самом деле *Carboxydocella* не относится ни к одному из ранее описанных семейств, поэтому этот род принято считать Incertae Sedis (неопределенное таксономическое положение).

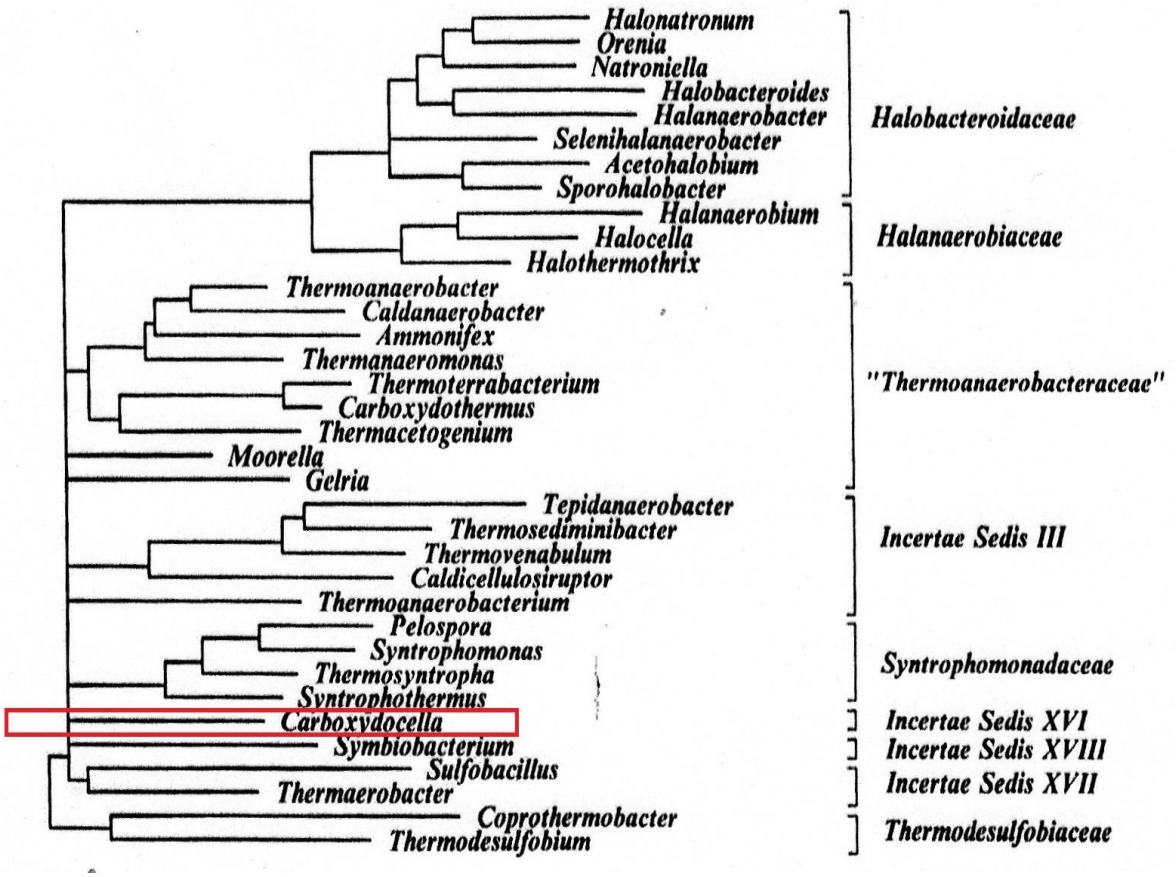

Рис. 1. Филогенетическое дерево порядков *Halanaerobiales, Thermoanaerobacterales* и некоторые глубокие ветви *Clostridiales.* (прим. Дерево основано на результатах анализа набора данных, состоящего из около 5000 почти полных высокоточных сиквенсов 16S-рРНК представителей *Firmicutes*. (Источник – Bergey's, 2009).

Род *Carboxydocella* содержит 4 вида:

-*Carboxydocella thermoautotrophica*

-*Carboxydocella sporoproducens*

-*Carboxydocella manganica*

-"*Carboxydocella ferrireducens*"

(**Прим.** Вид “*Carboxydocella ferrireducens*” не был валидно описан, т.е. его описание не было опубликовано в журнале International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology и, соответственно, название не было узаконено.)

Все представители рода *Carboxydocella* выделены из горячих источников Камчатки: *C. thermautotrophica* из источника в Долине Гейзеров, *C. sporoproducens* – из оз. Карымское, *“C. ferrireducens”*- из кальдеры Узон. Все виды *Carboxydocella* хемолитотрофно растут на 100% CO в газовой фазе, образуя CO_2 и водород. *C. thermautotrophica* и *C. sporoproducens* растут на CO автотрофно. *“C. ferrireducens”*нуждается в дополнительном источнике углерода, которым может быть ацетат (0.2 г/л), лактат (0.2 г/л) или дрожжевой экстракт (0.2 г/л). *“C. ferrireducens”* растет на CO также и в присутствии трехвалентного железа в виде гидроморфного оксида, образуя CO_2 и H_2. Во время роста происходит восстановление трехвалентного железа до двухвалентного, которое не нарушает заметно соотношение окисленного CO и образованного H_2. *C. thermautotrophica* - облигатный карбоксидотроф. *C. sporoproducens* органотрофно растет в атмосфере азота, сбраживая дрожжевой экстракт, сахарозу или пируват. *“C. ferrireducens”* органотрофно растет на глюкозе, пирувате, глицерине, мальтозе, лактозе. Кроме восстановления трехвалентного железа во время роста на CO.

Эти виды представлены палочковидными бактериями различной длины, с клеточной стенкой грам-положительного типа (см. рис. 2.1, 2.3). Клетки *C. sporoproducens* образуют споры (рис. 2.2).

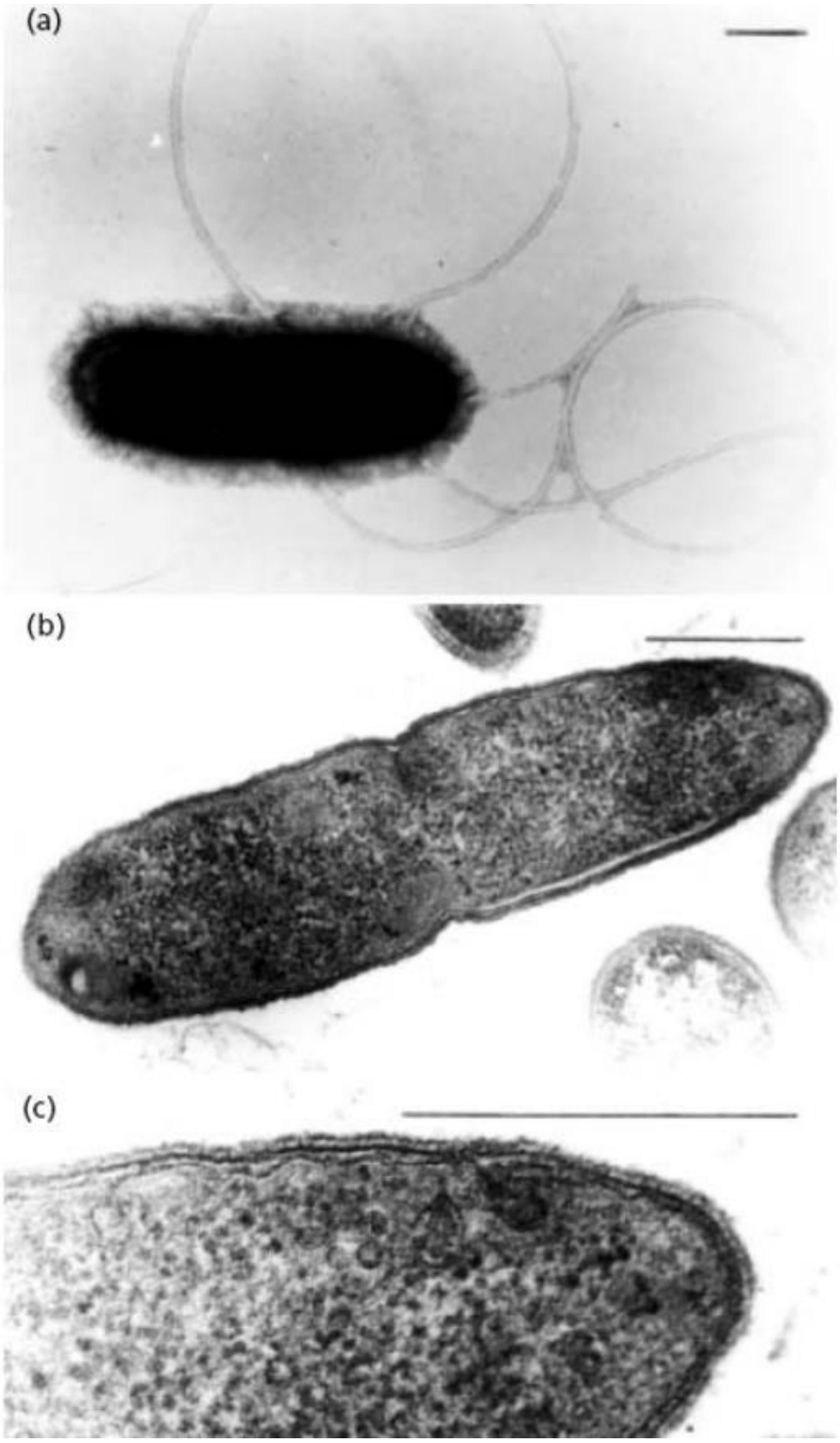

Рис. 2.1. Морфология *Carboxydocella thermoautotrophica* (штамм 41^T). Негативное контрастирование (a) и ультратонкие микросрезы (b, c). Шкала 0,5 мкм. (Источник – Соколова Т.Г., 2008)

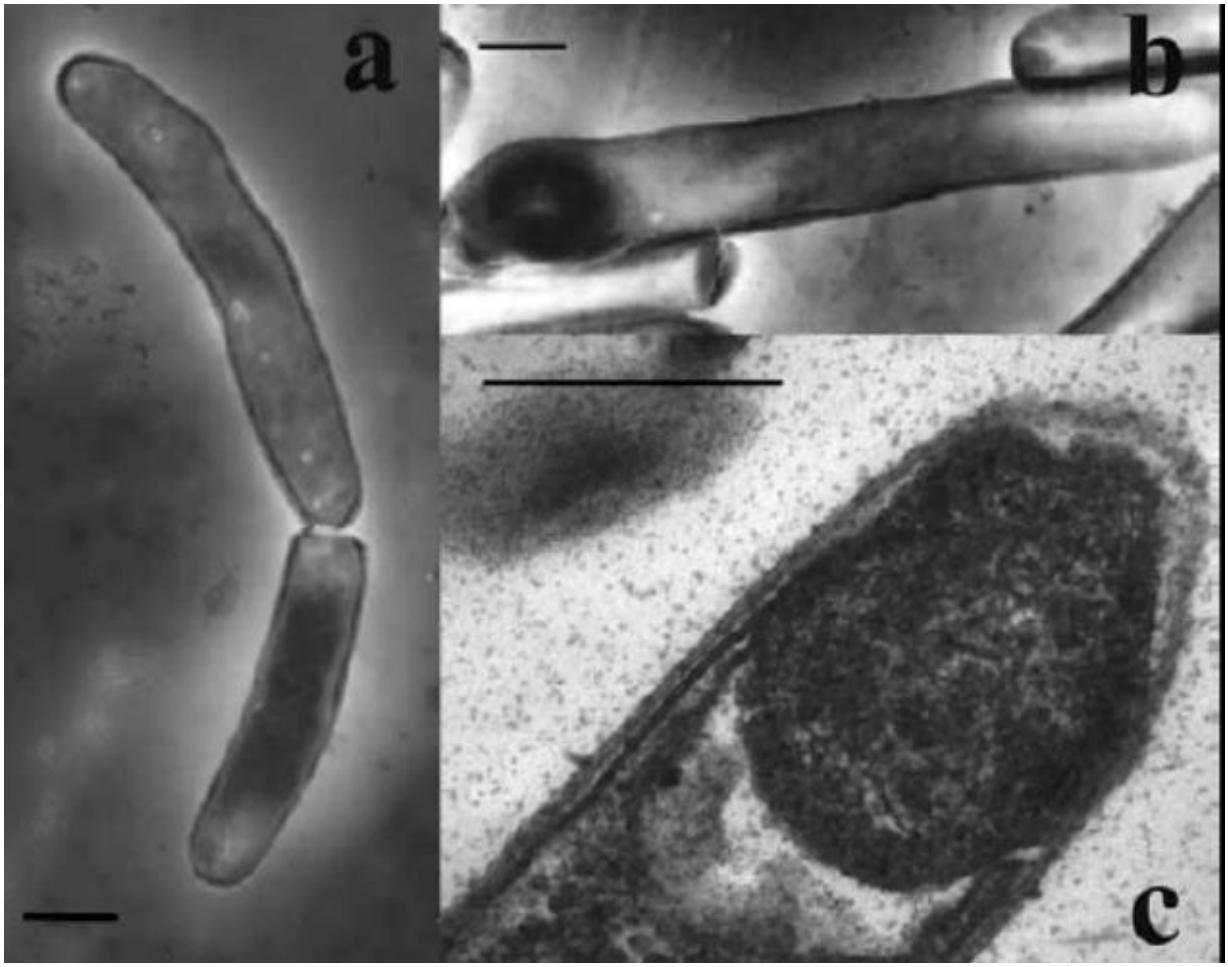

Рис. 2.2. Морфология *Carboxydocella sporoproducens* (штамм Kar^{T}). Негативное контрастирование (a, b) и ультратонкий микросрез (c). Шкала 0,5 мкм. (Источник – Соколова Т.Г., 2008)

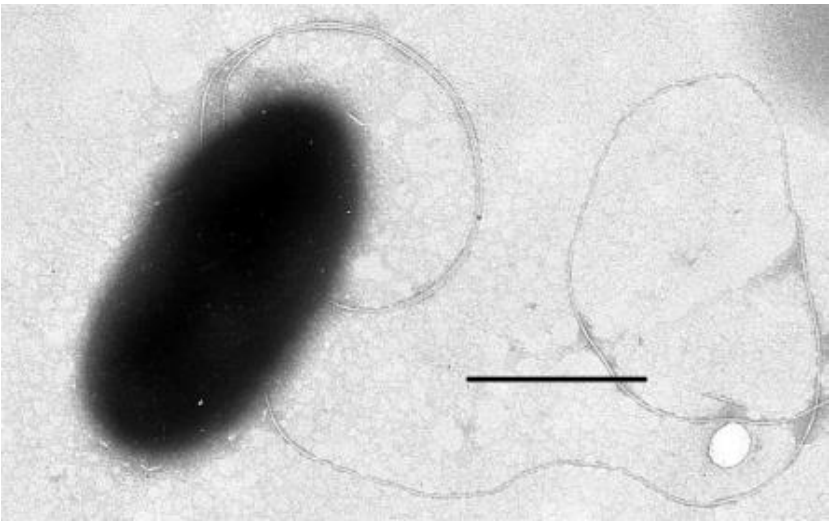

Рис. 2.3. Морфология *Carboxydocella ferrireducens* (штамм 019^T). Негативное контрастирование. Шкала 0,5 мкм. (Источник – Соколова Т.Г., 2008)

Представители рода *Carboxydocella* на твердой агаризованной среде в атмосфере, состоящей на 100% из CO образуют круглые колонии 0,5-1мм в диаметре. Растут на CO хемолитотрофно (источник энергии –

окислительно-восстановительные реакции, источник ионов – неорганические вещества). CO для них – единственный источник энергии, в соответствии с реакцией

$$CO + H_2O = CO_2 + H_2$$

Растут в пределах pH от 6,2 до 8,0 с оптимумом 6,8-7,0. Являются термофилами, растут при температуре от 40 до 70 ºC.

ЧАСТЬ 3: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

3.1. Культивирование объектов.

Выделение и культивирование чистых культур производили в герметично закрытых стеклянных пробирках и флаконах с резиновыми пробками (для возможности доступа к образцу с помощью шприца). Соотношение газовой (ГФ) и жидкой (ЖФ) фаз было 4:1(ГФ:ЖФ). Газовая фаза состояла на 95-100% из монооксида углерода (CO) и на 0-5% из азота (азот использовался при любых операциях с пробами, включающих вскрытие герметичной пробки для поддержания анаэробности среды).

Подготовку среды для культивирования объектов мы осуществляли следующим образом: в литре дистиллята разводили все неорганические соли, кроме восстановителей и соды (бикарбоната натрия), отмеряя строго установленное количество каждой соли при помощи тонких электронных весов на тонкой бумаге (вес бумаги выставлялся как 0, чтобы отмерять только вес самих веществ). После этого раствор кипятили под током азота (мы использовали технический азот, пропущенный через нагретую до 300°С стеклянную колонку, заполненную гранулами меди для освобождения от следов кислорода) и охлаждали до 40-60°С. После этого вносили витамины, дрожжевой экстракт, соду и восстановитель. После этого вносили индикатор резазурин. (Прим. Подробно состав среды указан в табл. 1). pH среды доводили до необходимого при помощи 6Н HCl.

Полученный раствор анаэробно разливали во флаконы/пробирки под тогом азота в соотношении ГФ:ЖФ 4:1 и герметично закрывали резиновыми пробками. После этого ГФ заменяли на СО продуванием и снова герметично закрывали резиновой пробкой и навинчивающимися колпачками (в случае флаконов) или обхватывающей алюминиевой крышкой (в случае пробирок) и автоклавировали. В случае если содержание оксида углерода (II)оказывалось ниже 95%, его вносили с помощью шприца через резиновую пробку перед стерилизацией. Если в готовой среде наблюдали признаки окисления (среда в таких случаях имеет розоватый цвет), пробирку/флакон признавали негодным к использованию и не использовали.

До кипячения	
	Кол-во (г/л) или мл
KCl	0,33г
MgCl 2. 2H 2 O	0,16г
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1 г
NH_4Cl	0,66 г
$KH2PO_4$	0,5 г
Na_2SiO_3	0,03 г
Дрожжевой экстракт (Difco)	0,05 г
Резазурин	0,0002 г
После кипячения и охлаждения под током азота	

Раствор микроэлементов (Кевбрин и Заварзин, 1992)	1мл
Раствор витаминов (Wolin *et al.,* 1963)	1мл
$Na_2S \cdot 9H_2O$	0,5г

Чистые культуры объектов получали методом предельных разведений (отличие от обычного метода заключалось в том, что выполняли не 8 10-кратных разведений, а 3 100-кратных и 1 10-кратное). После этого образцы высаживались на твердую среду для получения колоний. Мы использовали твердую среду типа “roll tubes”. Для получения такой твердой среды среду разливали под током азота по 5 мл в 18-мл пробирки с добавлением агара (в конечной концентрации 3% от общего объема). Газовую фазу замещали на 100% CO. Стерилизовали при 120°C. После вноса образца расплавленную среду в пробирке вращали на тонком слое воды, чтобы она распределилась по стенкам пробирки и застыла в таком состоянии. Пробирку с застывшим агаром инкубировали в термостате при заданной температуре.

Колонии из таких ролл-тюбов извлекали петлей, соскребая намеченные при предварительном осмотре колонии со стенок под током стерильного CO_2 и, также под током этого газа помещали в пробирку с 2мл анаэробно среды. После этого пробирку герметично закрывали и встряхивали, сохраняя при этом условия стерильности, после чего всё её содержимое переносили шприцом во флакон с жидкой средой в атмосфере CO. Из этого флакона отбирали инокулят для последующей серии разведений. Культуру, полученную после нескольких повторений данной процедуры, проверяли на чистоту путем наблюдения в микроскоп и высевания на среды с различными субстратами. Культуру считали чистой, если она сохраняла морфологическую однородность на разных субстратах. Чистота культуры также подтверждалась результатами секвенирования гена 16S рРНК.

Для получения клеточной массы разведение производили в 5л ферментере с 100% CO в атмосфере. Полученную биомассу осаждали последовательным трехэтапным центрифугированием при скорости 9500об./мин. – сначала в большой центрифуге в 500мл бутылях, потом в

средней центрифуге в 200мл фальконах, а после в малой центрифуге в 1мл эппендорфах. Клетки хранили при -18°C. Все действия, включающие разгерметизацию пробирки выполняли под током CO_2 или N_2, извлекали образцы при помощи стерильных шприцов над пламенем.

3.2. Идентификация отдельных штаммов *Carboxydocella* sp.

Во время повторения экспериментов, поставленных с штаммом *Carboxydocella thermoautotrophica* 41^T, у нас возникли отличия от ожидаемого результата. Мы предположили, что это происходило из-за загрязнения . Поскольку идентификация по 16S рРНК гену не выявила зарязнения, мы предположили, что возможно загрязнение близким штаммом таким как "C. *ferrireducens* "019. Геномный сиквенс штаммов 41 и 019, проведенный в Университете им. Канта (Калининград) показал их высокое сходство . Различие составляло всего 10%.

Действительно удачный способ определения нахождения в образце смеси штаммов удалось разработать Евгению Александровичу Таранову, аспиранту лаборатории гипертермофильных микробных сообществ ИНМИ РАН. Ему удалось обнаружить значительно отличающийся участок. Этим участком оказалась нуклеотидная последовательность, кодирующая малик энзим (фермент, катализирующий в цикле трикарбоновых кислот превращение L-малата в пируват). У двух штаммов эта последовательность ощутимо отличается по длине, что легко обнаружить, проведя гель электрофорез для продуктов ПЦР (полимеразная цепная реакция) со специфичными праймерами. Этой частью работы занимался сам Е. А. Таранов.

Проведенный им анализ первоначально использованной нами в данном исследовании культуры показал присутствие в ней двух штаммов. Для адекватного описания вида требовалось разделить эти штаммы и изучить их свойства.

Культуры, которые мы получали после серии предельных разведений и проведений через колонии мы отдавали на ПЦР для контроля чистоты колонии.

3.3. Оценка численности объектов в образце.

Оценку численности объектов в образце производили для того, чтобы понять, растут ли объекты в данных условиях, или нет. Для этого ровно 1 мл образца наблюдали иммерсионным методом микроскопии. Выбирали 20 случайных полей зрения и в них вычисляли число объектов. Наблюдения записывали, вычисляли среднее для данного образца и рассчитывали число клеток в образце по формуле

$$N=(n*S)/(V*s),$$

где N – количество клеток в образце, n – количество клеток в поле зрения, S – площадь покровного стекла в мм^2, s – площадь поля зрения микроскопа в мм^2, V – объём капли в мл.

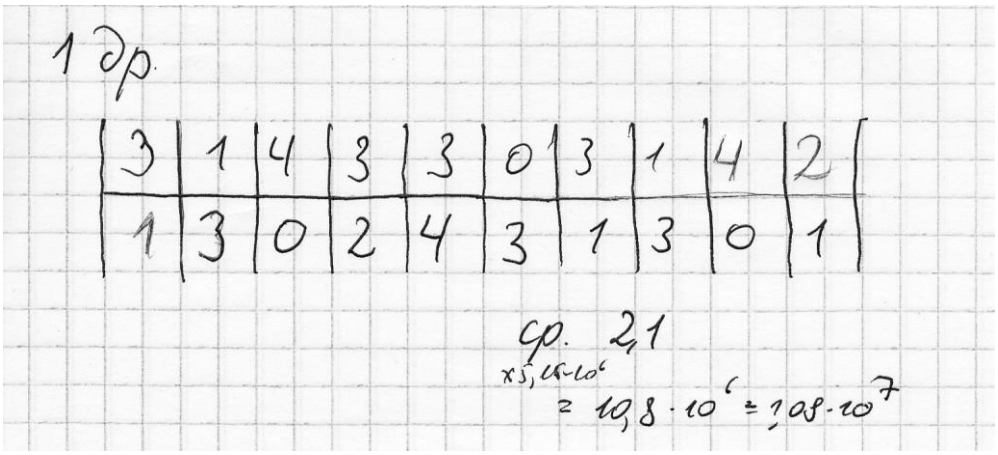

Рис. 3. Пример записи результатов наблюдения и подсчета приблизительного количества объектов в образце.

3.4. Проверка потребляемости объектами субстрата.

Для проведения тестов мы добавляли в среды следующие вещества: пируват, дрожжевой экстракт, глюкоза, фруктоза, сахароза, мальтоза, пептон, триптон, формиат, бутират, лактат, сукцинат, ацетат, пропионат, фумарат, малеинат, метанол, этанол, глицерол, ксилоза , арабиноза, лактоза, галактоза, целлобиоза, крахмал, цитрат, сера, сульфат, тиосульфат, AQDS, фумарат, дрожжевой экстракт;

-акцепторы NO2-, NO3-, кислород,

-$CH_3OH + NO_3^-$ в качестве акцептора;

Для оценки роста и использования субстратов и акцепторов использовали микроскопию, хроматографию для оценки использования водорода, CO , или метанола, тест полоски для определения использования нитрата или нитрита.

3.4.1. Хроматография.

Для проведения хроматографических анализов мы пользовались «Продвинутым» хроматографом «Спартак» с ПО для считывания и обработки результатов “Феникс” версии 3.5.3.

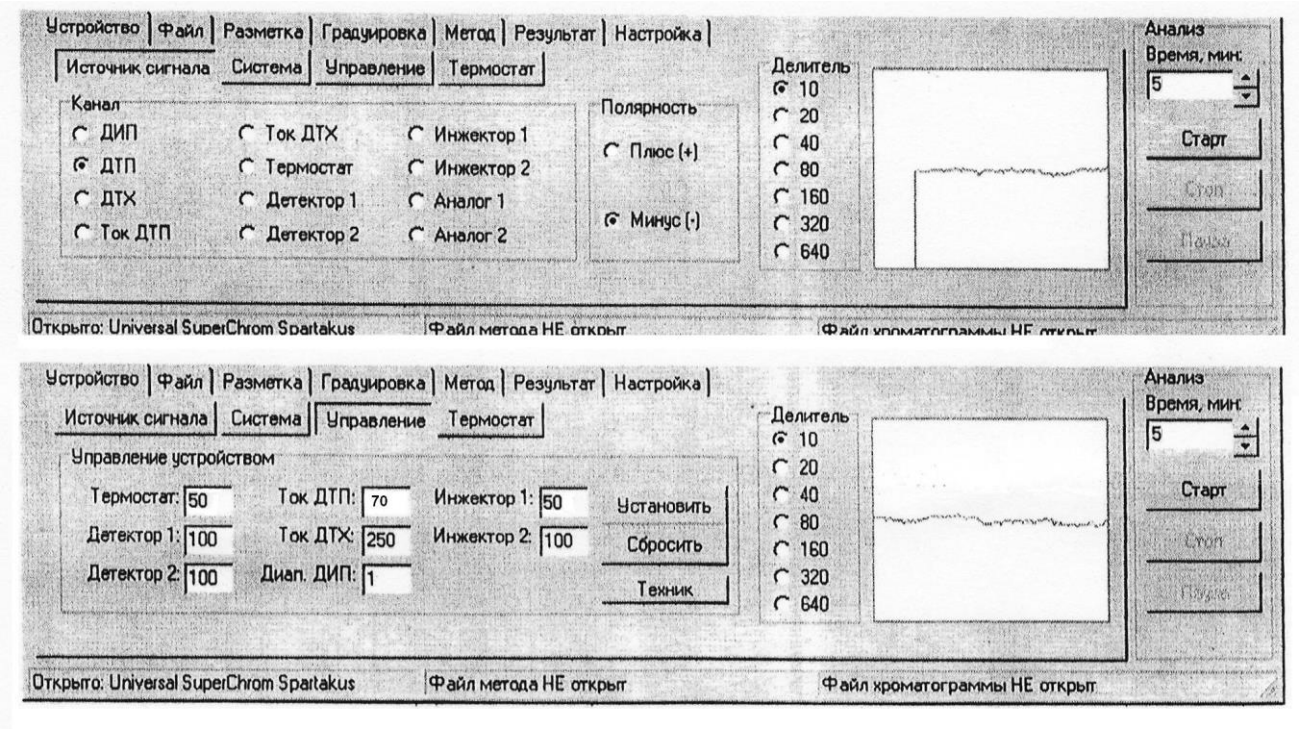

Рис. 4. Панель управления настройками хроматографа в программе «Феникс» с использованными нами параметрами.

Для определения концентрации H2 или CO отбирали шприцом 1 мл газовой фазы растущей культуры и вводили в газохроматографическую колонку наполнителем в которой был Poropaq

Для определения количества метанола образец вносили в колонку разогретого хроматографа специальным шприцом 1µl после нажатия кнопки «старт» и ожидали окончания. После к результату применяли метод «метанол.lin» и получали результат.

ЧАСТЬ 4: РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

В результате проведения смешаной культуры через колонии и предельные разведения штаммы 41 и 019 были разделены.

Штамм 41 в соответстви с исходным описанием (Sokolova et al., 2002) рос только на CO, образуя водород.

Штамм 019 оказался способным к росту с целым рядом сбраживаемых субстратов а также доноров и акцепторов электронов, которые приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Рост штамма 019 с различными донорами и акцепторами электронов.

Доноры электронов	Акцепоторы электронов	Источник углерода	рост
Ацетат	S^0	Ацетат	-
Дрожжевой экстракт	S^0	Дрожжевой экстракт	+
Пируват	S^0	пируват	-
Лактат	S^0	Лактат	-
H_2	S^0	Дрожжевой экстракт	-
H_2	S^0	Ацетат	-
H_2	CO_2	Дрожжевой экстракт	+
H_2	$S_2O_3^{2-}$	Дрожжевой	+

		экстракт	
H_2	$S_2O_3^{2-}$	Ацетат	-
H_2	$S_2O_3^{2-}$	HCO_3^-	-
H_2	$S_2O_3^{2-}$	Пируват	-
H_2	NO_3^-	Дрожжевой экстракт	-
H_2	NO_3^-	Ацетат	-
H_2	NO_3^-	пируват	-
H_2	NO_3^-	Лактат	-
CO	H_2O	Дрожжевой экстракт	+
CO	H_2O	Ацетат	+
CO	H_2O	пируват	-
CO	H_2O	Лактат	+
Метанол	AQDS	Дрожжевой экстракт	-
Ацетат	AQDS	Дрожжевой экстракт	-
Лактат	AQDS	Дрожжевой экстракт	-
Глицерин	AQDS	Дрожжевой экстракт	-
Метанол	$S_2O_3^{2-}$	Дрожжевой экстракт	+
Ацетат	$S_2O_3^{2-}$	Дрожжевой	-

		экстракт	
Лактат	$S_2O_3^{2-}$	Дрожжевой экстракт	-
Глицерин	$S_2O_3^{2-}$	Дрожжевой экстракт	+
Метанол	SO_4^{2-}	Дрожжевой экстракт	+
Ацетат	SO_4^{2-}	Дрожжевой экстракт	-
Лактат	SO_4^{2-}	Дрожжевой экстракт	-
Глицерин	SO_4^{2-}	Дрожжевой экстракт	-
Метанол	NO_3^-	Дрожжевой экстракт	+-
Ацетат	NO_3^-	Дрожжевой экстракт	+-
Лактат	NO_3^-	Дрожжевой экстракт	-
Глицерин	NO_3^-	Дрожжевой экстракт	-

Тест-полоски показали, что в случае роста на метаноле с нитратом происходит образование нитрита. Прямой счет клеток показал рост, превышающий рост в контроле (без акцептора или без донора). Хроматографически было зафиксировано некоторое потребление метанола, но точность проведенных измерений оказалась недостаточной для достоверного определения процесса.

Штамм 019 оказался способен к росту на следующих сбраживаемых субстратах :

глюкоза, пируват, глицерин, мальтоза, лактоза, сахароза, дрожжевой экстракт. Не было роста на галактозе, пептоне, лактате.

4.1. Исправленное описание *Carboxydocella thermautotrophica.*

Клетки короткие прямые палочки. Клеточная стенка Грам-положительного типа строения. Клеточное деление перетяжкой. Облигатные анаэробы. Колонии на твердой агаризованной среде в атмосфере 100% CO круглые, белые, 0,5-1 мм в диаметре. Гидрогеногенные карбоксидотрофы. Растут на CO хемолитотрофно. Используют CO в качестве единственного источника энергии в соответствии с уравнением

$$CO + H_2O = CO_2 + H_2$$

Нейтрофилы. Растут в пределах pH от 6,2 до 8,0 с оптимумом 6,8-7,0. Термофилы, растут при температуре от 40 до 70 ºC. Г+Ц содержание в ДНК составляет 47-49 мол%. Типовой штамм вида 41^T облигатно зависит от CO, рост на других субстратах не обнаружен. Другие штаммы, как 019 могут расти на сбраживаемых субстратах (глюкоза, пируват, глицерин, мальтоза, лактоза, сахароза, дрожжевой экстракт), могут использовать гидроморфный оксид трехвалентного железа, тиосульфат или нитрат в качестве акцепторов электронов, водород, глицерин или метанол в качестве доноров электронов. Донором электронов при росте с Fe(III) может быть CO, и главным восстановленным продуктом в этом случае является водород, при этом Fe(III) восстанавливается до Fe(II).

ЧАСТЬ 5: БЛАГОДАРНОСТИ.

Я благодарю моего научного руководителя Соколову Татьяну Геннадьевну и всех сотрудников лаборатории гипертермофильных микробных сообществ за помощь в проведении работы, начальника лаборатории Бонч-Осмоловскую

Елизавету Александровну за помощь в организации работы и Глаголева Сергея Менделевича за организацию работы.

ЧАСТЬ 6: СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бонч-Осмоловская Е.А., Мирошниченко М.Л., Слободкин А.В., Соколова Т.Г., Карпов Г.А., Кострикина Н.А., Заварзина Д.Г., Прокофьева М.Ю., Русанов И.И., Пименов Н.В. Биоразнообразие анаэробных литотрофных прокариот в наземных гидротермах Камчатки // Микробиология, 1999. —Т. 68. —№3. —стр. 398-406.

2. Заварзин Г.А. Бактерии и состав атмосферы. М.: «Наука», 1984. —200 с.

3. Пиневич А.В. Микробиология. Биология прокариотов. —СПб.: Изд-во СПбГУ, 2006. —Т. 1. —1144 стр.

4. Светличный В.А., Соколова Т.Г., Герхардт М., Заварзин Г.А. Новая группа анаэробных термофильных карбоксидобактерий, выделяющих водород //Доклады АН СССР, 1990. —Т. 314. —№ 3. —С. 742-744.

5. Соколова Т.Г. Термофильные гидрогеногенные карбоксидотрофные прокариоты. Дисс. на соиск. ст. док. биол. н. Москва, 2008. —283 стр.

6. Соколова Т.Г., Кочеткова Т.В., Лебединский А.В. Анаэробные термофильные гидрогеногенные карбоксидотрофные прокариоты в вулканических местах обитания. // Труды Института микробиологии им. С.Н.Виноградского. Выпуск 16. Термофильные микроорганизмы. —М.: МАКС Пресс, 2011. —стр. 64-87.

7. Bergamaschi P., Hein R., Heimann M., Crutzen P.J. Inverse modeling of the global CO cycle. // Journal of Geophysical Research, 2000. —vol. 105. —p. 909-1927.

8. Bergey's manual of systematic bacteriology. Second edition. —NY: Springer, 2009. —vol. 3. —1388 p.

9. Diekert G.B., Thauer R.K. (1978) Carbon-monoxide oxidation by Clostridium thermoaceticum and Clostridium formicoaceticum. // Journal Bacteriology, 1978. —vol. 136. —p. 597-606.

10. Dworkin, Martin, Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. The Prokaryotes. —NY: Springer, 2006. —vol. 1. —959pp.

11. Holland H.D. The chemical evolution of the Atmosphere and Oceans. —NJ: Princeton University Press, 1984. —598 pp.

12. Pinto, J.P., G.R. Gladstone, and Y.L. Yung. Photochemical production of formaldehyde in Earth's primitive atmosphere. // Science, 1980. —vol. 210. —№4466. —p. 183-185.

13. Savage M.D., Wu Z.G., Daniel S.L., Lundie L.L., Drake H.L. Carbon monoxide-dependent chemolithotrophic growth of Clostridium thermoautotrophicum. // Applied Environmental Microbiology, 1987.—vol. 53. —p. 1902-1906.

14. Slobodkina G.B., Panteleeva A.N., Sokolova T. G., Bonch-Osmolovskaya E.A. and Slobodkin A.I. Carboxydocella manganica sp. nov., a thermophilic, dissimilatory Mn(IV)- and Fe(III)-reducing bacterium from a Kamchatka hot spring. // Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012. —vol. 62. —p. 890-894.

15. Sokolova T.G., Kostrikina N.A., Chernyh N.A., Tourova T.P., Kolganova T.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Carboxydocella* thermoautotrophica gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic CO-utilizing thermophile from a Kamchatkan hot spring. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002. —vol. 52. —№6. —p. 1961-1967.

16. Spiess F. N. East Pacific Rise: Hot Springs and Geophysical Experiments. // Science, 1980. —vol.207. —№4438. —pp. 1421-1433.

17. Tindall B. J., Rossello ´-Mo ´ra R., Busse H.-J., Ludwig W. and Kampfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010. —vol. 60. —№1. —p. 249–266.