

ISSN 0201-8462



# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Mikrobiologichny Zhurnal

6

ТОМ 55

1993

# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ  
ЗАСНОВАНИЙ У БЕРЕЗНІ 1934 р.  
ВИХОДИТЬ ОДИН РАЗ У ДВА МІСЯЦІ

MIKROBIOLOGICHNÝ ZHURNAL

Том 55, № 6, листопад — грудень, 1993

КИЇВ

НАУКОВА ДУМКА

## З М І С Т

До 75-річчя академії наук України

Айзенман Б. Е. Из истории установления этиологии «НЗ» (неизвестного заболевания) . . . . . 3

### Експериментальні праці

Ястремская Л. С. Идентификация термофильных анаэробных микроорганизмов, изолированных из метантенка . . . . .	8
Ситайло С. Э., Скрипаль И. Г., Бабичев В. В. Физико-химические свойства ДНК-азы <i>Mycoplasma fermentans</i> PG-18 . . . . .	17
Коробкова Е. С. Бесклеточная система трансляции на основе рибосом молликутов . . . . .	24
Бабичев В. В., Скрипаль И. Г., Безуглый С. В., Панченко Л. П., Шаламай А. С., Макитрук В. Л., Гончаренко В. С., Шимко Н. Н. Олигодезоксирибонуклеотиды, комплементарные участкам рибосомального оперона молликутов, как ингибиторы транскрипции <i>in vitro</i> . . . . .	29
Товкач Ф. И., Ромась И. И., Рубан В. И., Кишко Я. Г. Природа прикрепительных рецепторов умеренных фагов 49 и 59 <i>Ergwinia sarotovoga</i> . . . . .	36
Жук И. П. Устойчивость соматических клонов томата к вирусу табачной мозаики . . . . .	41
Василевская И. А., Саая Б. И., Михновская Н. Д., Костюченко И. П., Сергейчук М. Г. Характер взаимоотношений различных серотипов <i>Bacillus thuringiensis</i> между собой и с другими видами рода <i>Bacillus</i> . . . . .	46
Харченко С. Н., Павленко О. И., Марочкин П. И., Теа Э. М., Семенюк А. В. Антагонистическая активность бактериальной флоры кормов в отношении возбудителя диарей телят . . . . .	50
Фильчаков И. В., Фильчаков Ф. В., Иваненко В. К., Благодатный В. Н., Ближнюк И. А. Антибактериальные эффекты гомологичных интерферонов при экспериментальной стафилококковой инфекции . . . . .	57
Надри Наср-Алла. Антимикробное действие липосомального препарата — липина Квасникова Е. И., Ключникова Т. М., Касаткина Т. П. Биология бактерий, используемых при очистке промышленных сточных вод от тяжелых металлов . . . . .	62

УДК 579.83:579.851.11:579.851.12

Л. С. Ястремская

Ин-т микробиологии и вирусологии АН Украины, Киев

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТЕРМОФИЛЬНЫХ АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ МЕТАНТЕНКА

*Из термофильной накопительной метаногенной культуры, выделенной из активного ила метантенка станции биологической очистки сточных вод (СБО, Киев, Бортнички), были изолированы первичные анаэробы — термофильные целлюлолитические, сахаролитические штаммы и вторичные анаэробы — метанобразующие бактерии.*

*Исследованы морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства выделенных изолятов. На основании исследованных свойств выделенные штаммы идентифицированы как Clostridium thermocellum 5CT, C. thermosaccharolyticum 1S; метаногенные бактерии отнесены к родам Methanobacterium, Methanosarcina.*

*Ключевые слова:* анаэробноз, термофильные бактерии, метанобразующие бактерии, биогаз, род Clostridium

Среди многочисленных видов анаэробных бактерий на сегодняшний день наибольший интерес для современной биотехнологии представляют метаногенные и клостридиальные (целлюлолитические, сахаролитические) микроорганизмы. Это связано с тем, что продуктами метаболизма данных бактерий являются перспективные энергоносители (метан, водород, этанол, бутанол), органические кислоты (ацетат, пропионат, бутират), витамины группы В, преимущественно важные ферменты (целлюлазы, гемицеллюлазы и т. д.). Особое внимание уделяется сейчас термофильным представителям этих групп бактерий, что связано в этом случае с облегчением реализации технологических процессов (большая надежность соблюдения стерильности, более высокие метаболические скорости и др.).

В связи с этим целью наших исследований являлись выделение и идентификация термофильных анаэробных бактерий, осуществляющих трансформацию органических веществ с образованием энергоносителей.

**Материал и методы.** Объектами исследований были штаммы термофильных анаэробных бактерий, изолированные из накопительной культуры, выделенной из активного ила метантенка станции биологической очистки сточных вод (Киев, Бортнички).

Выделение термофильной накопительной культуры проводили на минеральной среде «Р» следующего состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,4;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  — 0,4;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  — 1,0;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  — 0,1;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  — 0,2;  $\text{NaHCO}_3$  — 1,0;  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  — 0,5; 0,2 % -й раствор резазурина — 1 мл; вода дистиллированная до 1 л; pH среды 7,0 — 7,5. Микроэлементы и витамины вносили в среду согласно составу, приведенному в работах Pfennig и Lippert [26], а также Wolin с соавт. [29] соответственно. Витамины в ряде случаев заменяли дрожжевым экстрактом — 2 мл/л. В качестве энергетического углеродного субстрата использовали целлюлозу (фильтровальную бумагу) — 10 г/л, которую применяли в виде полосок или размельченной. Для приготовления плотных сред применяли очищенный агар «Дифко» или агар «Бакто» (США) — 20—25 г/л.

Для выделения чистых культур была использована та же среда «Р», что и для накопительной культуры. В качестве углеродного субстрата для выделения чистых культур целлюлолитических бактерий применяли целлюлозу (1,0 %) или целлобиозу (0,5 %); для выделения

сахаролитических бактерий — целлобиозу (0,5 %) или глюкозу (1,0 %); метаногенных — метанол (0,5 %), ацетат натрия, формат натрия, метиламины (по 0,15 %), смесь водорода и углекислого газа в соотношении 80 : 20. Использовали стандартную двуокись углерода (ГОСТ 8050-85). Для получения водорода применяли генератор водорода типа ГГС-2.

Для очистки метаногенов от сопутствующей микрофлоры использовали антибиотики кефзол, ампинокс, бензилпенициллина натриевую соль в концентрации 0,12 г/л.

Растворы витаминов, углеводов и антибиотиков стерилизовали фильтрованием через фильтры «Синпор» № 8, 9 так, как описано ранее [12], хранили отдельно в анаэробных условиях и вносили в среду непосредственно перед посевом стерильно шприцем.

Среды разливали по методике, описанной в работе Данько [2].

Для выделения чистых культур из накопительных был применен метод предельных разведений бактериальной суспензии с последующим рассевом на агаризованные среды (2—2,5 % агара) в чашки Петри, пробирки или агаровые цилиндры с целью получения отдельных колоний [8].

Пересев и инкубирование культур осуществляли в анаэробных условиях в токе инертного газа аргона [7, 11] с использованием стеклянного анаэростата [13]. В работе применяли инертный газ аргон (ГОСТ 10157—79), выпускаемый отечественной промышленностью, который содержит  $O_2$  в концентрации не выше 0,0007 %. Для удаления следовых концентраций кислорода из анаэростата применяли сероводород, который получали, как описано в работе Таширева [8].

Рост культур оценивали по величине оптической плотности суспензии, измеренной на фотоэлектрокалориметре ФЭК-56П при  $\lambda$  540 нм в кювете с длиной светового пути 0,5 см, а также по выделению газов —  $H_2$ ,  $CO_2$ ,  $CO_4$ . Рост целлюлолитических бактерий определяли также визуально — по степени разрушения целлюлозы.

Состав газов анализировали на хроматографе ЛХМ-8МД. Для определения  $H_2$ ,  $O_2$  и  $CH_4$  использовали стальную колонку длиной 1,5 м и диаметром 3 мм, заполненную молекулярными ситами 5а, фракции 0,25 мм. Для определения  $CO_2$  применяли стальную колонку длиной 2,5 м и диаметром 3 мм, заполненную полисорбом-1. Температура колонок — 30 °С, газ-носитель — аргон, скорость потока — 30 мл/мин, детектор — катарометр, ток детектора — 80 мА. Пробы газовой фазы отбирали шприцем, объем вводимой пробы — 0,5 мл.

Определение жирных кислот и спиртов производили на хроматографе «Сигма-5». Для определения ацетата, этанола, лактата, бутирата и пропионата использовали стеклянную колонку длиной 2,4 м и диаметром 3 мм, заполненную носителем парапаком-Q. Температура колонок — 190 °С, испарителя — 220 °С, детектора — 200 °С. Газ-носитель — гелий, скорость потока — 30 мл/мин, детектор — пламенно-ионизационный, ток детектора — 150 мА. Пробы центрифугировали при 10000 g в течение 20 мин. Жирные кислоты и спирты определяли в супернатанте. Объем вводимых проб — 5—10 мкл.

Морфологию клеток изучали на микроскопе МБИ-6 в фазовом контрасте ( $\times 1570$ ). Окраску клеток по Граму проводили общепринятыми методами [7].

Проверяли способность целлюлолитических и сахаролитических штаммов использовать различные субстраты: натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы порошковую целлюлозу, применяемую для тонкостойной хроматографии, целлюлозу «авицел», крахмал, гликоген, пектин, целлобиозу, трегалозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, глюкозу, рибозу, арабинозу, маннозу, фруктозу, галактозу, ксилозу, маннит, рамнозу, дульцит, эскулин, салицин. Концентрация субстратов в среде — 1 %.

Разжижение желатины наблюдали в столбиках желатины, приготовленной на основе солевой среды. Образование индола и сероводорода определяли качественно [6]. Восстановление нитрата исследовали

на среде с  $\text{NANO}_3$  в концентрации от 0,01 до 1 г/л и 0,2 %-й целлюброзой. Тест на каталазу и оксидазу проводили, используя приведенное руководство [7].

Образование нитрита определяли с помощью сульфаниловой кислоты и диметил- $\alpha$ -нафтиламина [7].

ДНК выделяли по методу Мармура [7] из клеток, лизированных лизоцимом. Содержание гуанина и цитозина (моль %) в ДНК установ-

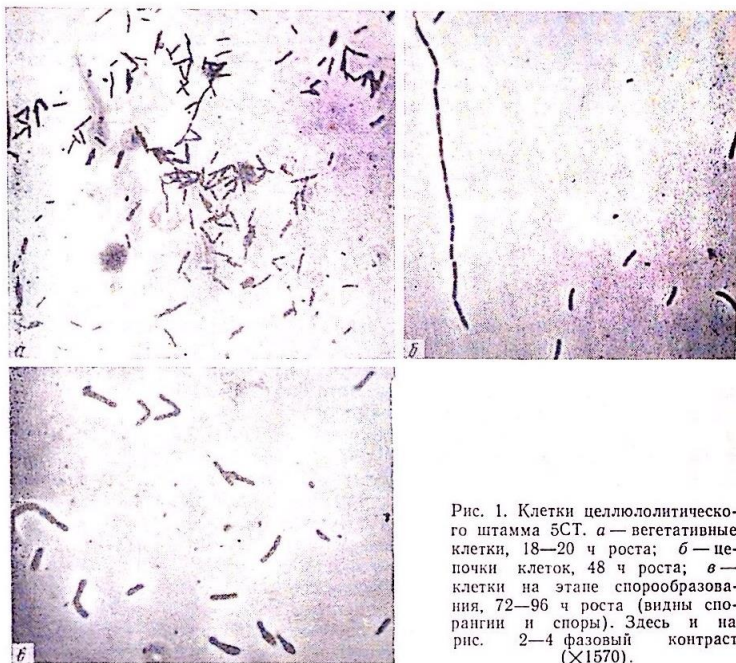


Рис. 1. Клетки целлюлолитического штамма 5СТ. а — вегетативные клетки, 18—20 ч роста; б — почочки клеток, 48 ч роста; в — клетки на этапе спорообразования, 72—96 ч роста (видны спорангии и споры). Здесь и на рис. 2—4 фазовый контраст ( $\times 1570$ ).

ливали путем определения ее температуры плавления. Кривую плавления ДНК получали с помощью регистрирующего электрофотометра DU-8.

Исследуемые штаммы идентифицировали по 9-му изданию определителя Берги [15] и оригинальным работам [3—5, 10, 14—25, 27—34].

**Результаты и их обсуждение.** Из активного ила метантенка станции биологической очистки сточных вод нами была выделена термофильная (55—60 °С) накопительная анаэробная культура, гидролизующая целлюлозу с образованием метана. Из нее в дальнейшем были изолированы: первичные анаэробные, термофильные целлюлолитические и сахаролитические штаммы и вторичные анаэробы — метанобразующие бактерии.

**Первичные анаэробы.** Проведена идентификация двух штаммов первичных анаэробов, участвующих в деструкции органических веществ — целлюлолитического штамма 5СТ, использующего целлюлозу, и сахаролитического штамма 1S, сбраживающего сахара.

**Штамм 5СТ.** Вегетативные клетки выделенного штамма представляют собой прямые, чуть изогнутые палочки размером 0,5—0,6 $\times$ 1,5—2,5 мкм, единичные, парные или в цепях, иногда образуют длинные нити до 10 мкм (рис. 1). Размеры клеток изменяются в динамике развития культуры; молодые клетки более короткие, по мере развития они

удлиняются. Подвижные за счет перитрихальных жгутиков. Грамотрицательные. При неблагоприятных условиях (рН ниже 6,4, температура выше 70 °С) образуются терминальные эндоспores. На поверхности плотной среды культура формирует мелкие, круглые, белые или прозрачные колонии размером 1—2 мм. В глубине целлюбиозного агара — колонии чичевичеобразные, белые.

Облигатный анаэроб. Растет в диапазоне температур 45—65 °С, оптимальная температура — 55—60 °С. Оптимальный рН — 7,0—7,5, при рН выше 8,0 и ниже 6,5 рост отсутствует.

При изучении способности выделенного штамма использовать для роста различные источники углерода было показано, что штамм 5СТ способен ферментировать кроме целлюлозы и целлюбиозы также арабинозу, глюкозу, галактозу, сахарозу, ксилозу, слабо — фруктозу (табл. 1). На богатых питательных средах — МПА, МПБ, КПА — не растет. Рост наблюдается на минеральной среде «Р» (описанной выше) с дрожжевым экстрактом, который может быть заменен смесью витаминов. На жидкой среде с целлюлозой культура образует желтый пигмент, который может утрачиваться при многократных пересевах, но способность культуры гидролизовать целлюлозу сохраняется. При росте на целлюбиозе, глюкозе и фруктозе проявляется слабая пигментация.

Основными экзометаболитами являются этанол, ацетат, водород, углекислый газ и лактат. Желатин не разжижает, нитраты не восстанавливает. Индол не образует. Кatalаза и оксидаза отсутствуют.

Значения показателя содержания Г+Ц в ДНК, полученное нами для штамма 5СТ, составляет 39,04 моль %.

Таблица 1. Дифференциация видов грамотрицательных термофильных, целлюлолитических бактерий рода *Clostridium*

Диагностические признаки	Штамм 5 СТ	<i>C. thermocellum</i> [15—17, 23—25]	<i>C. stercorarium</i> [20]	<i>C. thermocopriae</i> [19]	<i>C. cellulostri</i> [30]
Размер клеток, мкм	0,5—0,6× ×1,5—2,5	0,5—0,7× ×2,5—5,0	0,7—0,8× ×2,7—7,7	0,4—0,7× ×2,0—8,0	0,3—0,6× ×2,0—15,0
Оптимальная температура, °С	55—60	60	65	60	55—60
Оптимальный рН	7,0—7,3	7,0—7,3	7,3	6,5—7,3	7,3—7,5
Использование субстратов					
целлюлозы	+	+	+	Сл. +	+
крахмала	—	—	+	+	+
гликогена	—	—	+	+	+
целлюбиозы	+	+	+	Сл. +	+
трегалозы	Н.б.	—	+	+	+
мальтозы	—	—	+	Сл. +	+
лактозы	—	—	+	+	+
сахарозы	+	—	+	+	+
глюкозы	+	+	+	+	+
рибозы	—	—	—	Сл. +	Н.д.
арабинозы	+	—	+	+	—
маннозы	—	—	+	+	+
фруктозы	Сл. +	+	+	+	+
галактозы	+	—	+	Сл. +	+
ксилозы	+	+	+	Н.д.	+
маннитола	—	—	—	—	+
рамнозы	—	—	+	—	—
рафинозы	—	—	—	+	+
салicina	—	—	+	+	+
Продукты брожения*					
Образование H <sub>2</sub> S	Э, А, Л	Э, А, Л	Э, А, Л	Б, А, Л, Э	Э, А
Г+Ц, моль %	39,04	38—40	39	36,7—37,8	35

Примечание: «+» — положительный признак; «—» — отрицательный признак; «Сл.» — признак выражен слабо; «+—» — реакция у штаммов различна; «Н.д.» — нет данных; «Н.б.» — не определяли; «Б» — бутират; «Э» — этанол; «Л» — лактат; «А» — ацетат. \* Все штаммы при ферментации образуют водород и углекислый газ. \*\* Только на целлюлозе.

*Штамм 1S.* Вегетативные клетки штамма 1S представляют собой подвижные палочки, единичные, парные, в цепях, образующие длинные нити. Штамм 1S имеет более крупные размеры клеток ( $0,6-0,8 \times 3,0-5,0$  мкм) по сравнению с целлюлолитическим штаммом 5СТ. В экспоненциальной фазе роста — отрицательная реакция при окраске по Граму, при переходе в стационарную фазу — грамположительная. Образует терминальные, круглые споры. Споруляция наступает через 22—30 ч на

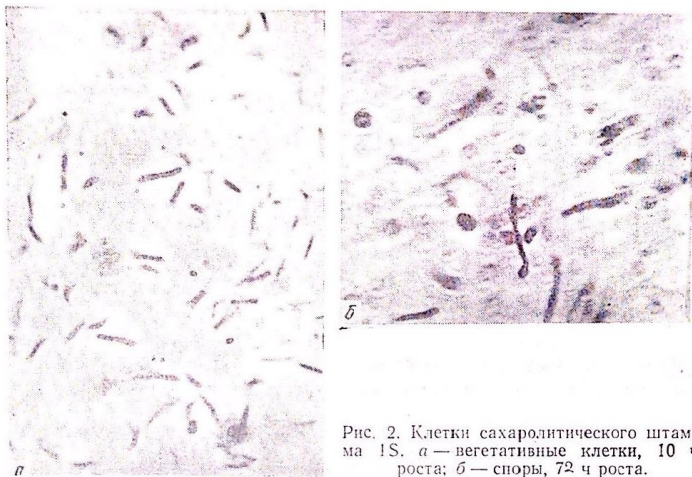


Рис. 2. Клетки сахаролитического штамма 1S. а — вегетативные клетки, 10 ч роста; б — споры, 72 ч роста.

среде с целлюлозой (рис. 2) и через 10 ч — на среде с ксилзой или арабинозой (при pH ниже 6,0). Поверхностные колонии бело-кремовые, блестящие, выпуклые, 1—2 мм в диаметре, с ровными краями. Глубинные колонии — мелкие, ланцетовидные.

Облигатный анаэроб. Растет в диапазоне температур 45—70 °С, оптимальная температура — 55—60 °С. Оптимальное значение pH 7,0—7,3. При pH ниже 5,0 и выше 8,0 рост не наблюдается.

Штамм 1S растет на среде «Р» с добавлением дрожжевого экстракта или витаминов. Использует различные источники углеродного питания: пектин, крахмал, целлюлозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, глюкозу, фруктозу, галактозу, рибозу, маннозу, ксиллозу, арабинозу (табл. 2). Не использует целлюлозу, салицил, маннитол, эскулин, амигдалин. Основными продуктами ферментации являются водород, углекислый газ, этанол, ацетат, бутират, лактат, в незначительных количествах образуется пропионат.

Желатину не разжижает, индол не образует, нитраты не восстанавливает.

Значение Г+Ц в ДНК для штамма 1S составляет 31,9 моль%.

На основании физиолого-биохимических и морфолого-культуральных признаков изолированные штаммы 5СТ и 1S отнесены к роду *Clostridium*. Принадлежность к роду исследованных штаммов была определена на основании следующих дифференцирующих [17] признаков: способность образовывать эндоспоры, облигатно-анаэробный характер энергетического метаболизма, отсутствие способности осуществлять дисимбиотическое восстановление сульфата. Штаммы отнесены к группе сахаролитических клостридий, большинство из которых — грамположительные бактерии.

Исследованный нами штамм 5СТ дает отрицательную реакцию при окраске по Граму. В связи с этим мы сравнивали его свойства с описанными в литературе свойствами грамотрицательных термофильных клостридий, способных гидролизировать целлюлозу и ее производные —

*Clostridium thermocellum* [15—17, 23—25], *C. stercorarium* [20] *C. thermocopriae* [19], *C. cellulosi* [30] (табл. 1).

Изолированный нами штамм 5СТ отличается от *C. stercorarium* по ряду морфолого-культуральных признаков (размер клеток, характер роста на плотных средах, оптимальная температура, пигмент). От *C. thermocopriae* и *C. cellulosi* штамм 5СТ отличается по образуемым продуктам метаболизма при ферментации целлюлозы (или целлюбиозы) и содержанию Г+Ц в ДНК (табл. 1).

По большинству признаков выделенный нами штамм 5СТ наиболее близок к *C. thermocellum*. Однако, в отличие от *C. thermocellum* [15—17, 23—25], штамм 5СТ способен ферментировать более широкий круг субстратов (сахарозу, арабинозу, галактозу, глюкозу, ксилозу, слабо — фруктозу). Способность ферментировать глюкозу, ксилозу и фруктозу штаммом *C. thermocellum* была ранее отмечена также в работах Ng с соавт. [24, 25].

Величина содержания Г+Ц в ДНК, полученная нами для штамма 5СТ, предварительно идентифицированного как *Clostridium thermocellum*, подтвердила принадлежность исследованного нами штамма к данному виду, для которого значение Г+Ц в ДНК находится в пределах 38—40 моль %.

По ряду свойств (термофильность, облигатный анаэроб, образование спор) сахаролитический штамм 1S близок к *C. thermosaccharolyticum*, *C. thermohydrosulfuricum*, *C. thermobutyricum* [15, 17, 18, 22, 27, 28]. Однако изолированный нами штамм 1S отличается от *C. thermohydrosulfuricum* по некоторым морфолого-культуральным признакам (размер клеток, оптимальная температура роста, неспособность образовывать метанол, формиат. В отличие от *C. thermobutyricum* штамм

Таблица 2. Признаки, дифференцирующие виды термофильных сахаролитических бактерий рода *Clostridium*

Диагностические признаки	Штамм 1S	<i>C. thermosaccharolyticum</i> [15, 17, 18, 22]	<i>C. thermohydrosulfuricum</i> [15, 17, 18, 28]	<i>C. thermobutyricum</i> [27]
Размер клеток, мкм	0,6—0,8× ×3,5—16,0	0,4—0,7× ×2,4—16,0	0,4—0,6× ×1,8—13,0	0,9—1,1× ×2,0—4,5
Образование спор	Т	Т	Т	С
Оптимальная температура, °С	55—60	55—62	67—69	55
Оптимальный pH	7,0—7,3	7,0	6,9—7,5	6,8—7,1
Используемые субстраты*				
крахмал	+	+	+	—
гликоген	Н.о.	+	—	—
пектин	+	+	+	Н.д.
лактоза	+	+	+	—
сахароза	+	+	+	—
манноза	+	+	+	—
фруктоза	+	+	+	+
галактоза	+	+	+	—
арабиноза	+	+	+	—
амигдалин	—	+	—	—
салицин	—	+	+	Н.д.
эскулин	—	+	—	—
пируват	Н.о.	+	—	+
Продукты брожения**	Э, А, Б, Л, П	Э, А, Б, Л	Э, Л, Ф, Б, М***	Б, А, Л
Образование H <sub>2</sub> S	—	—	+	+
Разжижение желатинны	—	—	—	+
Г+Ц, моль %	31,9	29—32	35—37	37

Примечание: «+» — положительный признак; «—» — отрицательный признак; «Н. о.» — не определяли; «+—» — реакция у штаммов различна; «А» — ацетат; «Э» — этанол; «Л» — лактат; «М» — метанол; «Б» — бутират; «Ф» — формиат; «П» — пропионат; «Т» — терминальные; «С» — субтерминальные. \* Все штаммы используют целлюбиозу, мальтозу, глюкозу, рибозу, ксилозу. \*\* У всех штаммов продуктами брожения являются водород и углекислый газ. \*\*\* Образует метанол при росте на пектине.



1S образует терминальные споры. Одним из основных продуктов метаболизма является этанол, в то время как *C. thermobutyricum* этанол не образует. У *C. thermobutyricum* значительно выше содержание Г+Ц в ДНК, чем у штамма 1S. Наиболее близок штамм 1S к *C. thermosaccharolyticum*, но штамм 1S образует (кроме этанола, ацетата, бутирата) пропионат при росте на среде с целлюброзой.

Содержание Г+Ц в ДНК штамма 1S, составляющее 31,9 моль %, позволяет отнести его к виду *Clostridium thermosaccharolyticum*.

**Метаногены.** Выделение чистых культур метанообразующих бактерий требует более сложного подхода, чем в случае целлюлолитических и сахаролитических бактерий, так как метаногены более чувствительны к кислороду и нуждаются в соблюдении строгого анаэробноза. Для очистки метаногенных культур от контаминирующей микрофлоры использовали антибиотики. Антибиотики ингибируют синтез пептидогликана клеточной стенки, подавляя тем

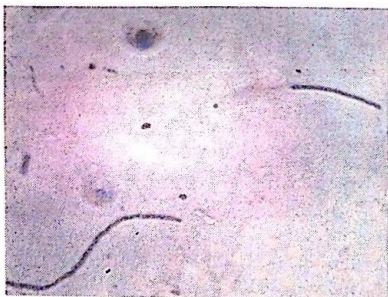


Рис. 3. Клетка метанообразующего штамма 13 М.

самым рост большинства микроорганизмов, но не влияют на рост метаногенов, в клеточной стенке которых пептидогликан отсутствует [1, 13, 21]. В результате было изолировано два термофильных метаногенных штамма — 13М и 84MS. Бактериологическую чистоту культуры опреде-

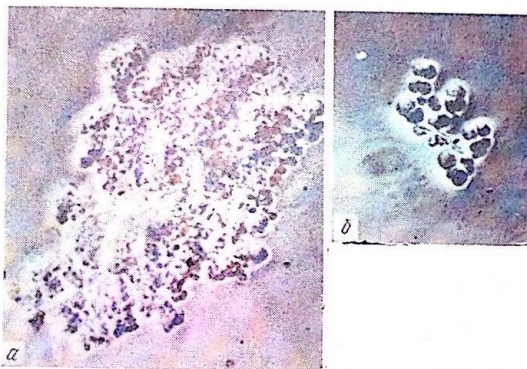


Рис. 4. Клетки метанообразующего штамма 84MS. а — общий вид колоний; б — отдельные пакеты клеток.

ляя по однородности колоний на плотной среде, морфологической однородности клеточной популяции при микроскопии, отсутствию роста и метанообразования на пептоно-глюкозной среде.

**Штамм 13М.** Рост и образование метана штаммом 13М наблюдали на минеральной среде «Р» с водород-углекислотной смесью в качестве единственного источника углерода и энергии. Рост отсутствовал на среде с ацетатом, формиатом, метанолом, метиламинами. Клетки штамма 13М — изогнутые палочки, часто образующие нити, размер 0,5—0,6××7—100 мкм (рис. 3). Грамположительные, неподвижные. Поверхностные колонии выпуклые, с ровным краем, коричневатые, округлой фор-

мы, 1—2 мм в диаметре. В жидкой среде культура растет в виде опалесцирующей суспензии.

Облигатный анаэроб. Рост и образование метана наблюдали в диапазоне температур 40—65 °С, оптимум — 55—60 °С. Диапазон pH 6,5—8,0, оптимальный pH — 7,0—7,5. Рост незначительно стимулировался при внесении в среду дрожжевого экстракта.

Сравнение диагностических признаков штамма 13М с описанными в литературе метаногенами [1, 13, 21, 31, 32] позволило отнести его к роду *Methanobacterium*.

*Штамм 84MS.* Рост и образование метана штаммом 84MS наблюдали на минеральной среде «Р». В качестве единственного источника углерода и энергии использует метанол, ацетат, метиламины, слабо — водород-углекислотную смесь. Клетки штамма — кокки (1—2 мкм в диаметре), которые размножаются дроблением в разных направлениях и объединяются по 2, 4, 8 в сарциноподобные пакеты (биотип I) [3, 5], неподвижные (рис. 4, а, б). Колонии на плотной среде — зернистые, желтоватого цвета — 0,5—1 мм в диаметре.

Облигатный анаэроб. Рост и образование метана наблюдали в диапазоне температур от 30 до 60 °С (оптимум — 55 °С) и при pH от 6,0 до 8,0 (оптимум — 6,8—7,0). Стимуляцию роста и метанообразования отмечали при добавлении дрожжевого экстракта.

Сравнение свойств выделенного штамма 84MS с таковыми известных в литературе метаногенов [1, 3—5, 21, 33, 34] позволило отнести его к роду *Methanosarcina*.

Таким образом, из термофильного метаногенного сообщества нами изолированы термофильные анаэробные штаммы бактерий, которые могут трансформировать сложные органические вещества в биотопливо. На основании морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств выделенные штаммы идентифицированы как *Clostridium thermocellum* 5СТ, *Clostridium thermosaccharolyticum* 1S, *Methanobacterium* sp. 13М, *Methanosarcina* sp. 84MS.

Л. С. Ястремська

Ин-т мікробіології і вірусології АН України, Київ

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТЕРМОФИЛЬНЫХ АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ МЕТАНТЕНКУ

### Резюме

З термофільної накопичувальної метаногенної культури, виділеної з активного мулу метантенку станції біологічного очищення стічної води (СБО, Київ, Бортничі), були ізолювані первинні анаеробні — термофільні целюлолітичні, цукролітичні штами та вторинні анаероби — метанутворюючі бактерії.

Досліджені морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості виділених ізолятів. На основі досліджених ознак ізолювані штами ідентифіковані як *Clostridium thermocellum* 5СТ, *C. thermosaccharolyticum* 1S; метанутворюючі бактерії віднесені до родів *Methanobacterium*, *Methanosarcina*.

L. S. Yastremskaya

Institute of Microbiology and Virology,  
Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

## IDENTIFICATION OF THERMOPHILIC ANAEROBIC MICROORGANISMS ISOLATED FROM METHANE TANK

### Summary

Primary anaerobes (thermophilic cellulolytic, saccharolytic strains) and secondary anaerobes (methane-forming bacteria) were isolated from the thermophilic accumulating methanogenic culture isolated

from active silt of methane tank at the station of biological purification of wastes (SBP, Kiev, Bortnich).

Morpho-cultural and physiologo-biochemical properties isolates are studied. Proceeding from the studied properties the isolated strains are identified as *Clostridium thermocellum* 5CT, *C. thermosaccharolyticum* 1S; methanogenic bacteria are attributed to genera *Metanobacterium*, *Methanosarcina*.

**Key words:** anaerobiosis, thermophilic bacteria, methaneforming bacteria, biogas, genus *Clostridium*

The author's address: *L. S. Yastremskaya*, Institute of Microbiology and Virology, Academy of Sciences of Ukraine, 154 Zabolotny St. Kiev, 252143, Ukraine

1. Беляев С. С. Метанобразующие бактерии: биология, систематика, применение в биотехнологии // Успехи микробиологии.—1988.—Вып. 22.—С. 169—206.
2. Данько Я. Н. Влияние различных экзогенных акцепторов и доноров электронов на образование метана метаногенными сообществами: Дис. ... канд. биол. наук.—Киев, 1988.—136 с.
3. Жилина Т. Н. Бiotины метаносарцины // Микробиология.—1976.—45, № 3.—С. 481—489.
4. Жилина Т. Н. Развитие чистой культуры метаносарцины — биотип 2 на ацетате // Там же.—1978.—47, № 3.—С. 396—399.
5. Жилина Т. Н., Заварзин Г. А. Образование цист метаносарциной // Там же.—1979.—48, № 3.—С. 451—456.
6. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований.—М.: Медицина, 1972.—С. 81.
7. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхарда.—М.: Мир, 1981.—Т. 1—3.—
8. Таширев А. Б., Данько Я. Н., Чернышенко Д. В. Техника выделения изолированных колоний анаэробных бактерий во флаконах // Микробиол. журн.—1988.—50, № 4.—С. 89—90.
9. Теоретические и методические основы изучения анаэробных микроорганизмов.—Пушчино: ИЦБИ АН СССР, 1978.—С. 7—45.
10. Храцова Т. И., Кострикина Н. А., Бирюзова В. И., Логинова Л. Г. Выделение *Clostridium thermocellum* из горячих источников Бурятии // Микробиология.—1986.—55, № 3.—С. 50—70.
11. Чернышенко Д. В., Ястремская Л. С., Карпенко В. И. Система фиксируемого газового зонда для удаления кислорода из анаэробных культиваторов и пробирок // Микробиол. журн.—1991.—53, № 3.—С. 100—102.
12. Ястремская Л. С., Чернышенко Д. В., Карпенко В. И. Стерилизация фильтрованием в анаэробных условиях // Там же.—1992.—54, № 4.—С. 82—84.
13. Ястремская Л. С., Чернышенко Д. В., Карпенко В. И. Стеклый анаэростат для культивирования анаэробных микроорганизмов на плотных средах // Там же.—1992.—54, № 4.—С. 84—88.
14. Balch W. E., Fox G. E., Magrum L. J. Methanogens: Reevaluation of unique biological group / Microb. Revs.—1979.—43.—P. 260—296.
15. Cato E. P., George W. L., Finegold S. M. The genus *Clostridium* // Bergey's manual of systematic bacteriology.—1986.—Vol. 2.—P. 1141—1200.
16. Freier D., Metharshed C. P., Wiegell J. Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20 // Appl. Environ. Microbiol.—1988.—54, N 1.—P. 204—211.
17. Gottschalk G., Andreesen J. R., Hippe H. The genus *Clostridium* (non medical aspects) // The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria.—Berlin: Springer—Verlag KG, 1981.—Vol. 2.—P. 1768—1804.
18. Hollaus F., Sleytr V. On the taxonomy and fine structure of some hyperthermophilic saccharolytic clostridia // Arch. Microbiol.—1972.—86.—P. 129—146.
19. Jin F., Yamasato K., Toda K. *Clostridium thermocopriae* sp. nov., a cellulolytic thermophile from animal feces, compost, soil, and a hot spring in Japan // Int. J. Syst. Bacteriol.—1988.—38, N 3.—P. 279—281.
20. Madden R. H. Isolation and characterization of *Clostridium stercorarium* sp. nov., cellulolytic thermophile // Ibid.—1983.—33.—P. 837—840.
21. Mah R. A., Smith M. R. Methanogenic bacteria // The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria.—Berlin: Springer—Verlag KG, 1981.—Vol. 1.—P. 948—977.
22. Mateuzzi D., Hollaus F., Biovatti B. Proposal of neotype for *Clostridium thermohydrosulfuricum* and merging of *Clostridium tartarivorum* with *C. thermosaccharolyticum* // Int. J. Syst. Bacteriol.—1978.—28.—P. 528—531.
23. McBees R. H. The characteristics of *Clostridium thermocellum* // J. Bacteriol.—1954.—67.—P. 505—506.

24. Ng T. K., Weimer R. J., Zeikus J. G. Cellulolytic and physiological properties of *Clostridium thermocellum* // Arch. Microbiol.—1977.—114, N 1.—P. 1—7.
25. Ng T. K., Ben-Bassat A., Zeikus J. G. Ethanol production by thermophilic bacteria: fermentation of cellulose substrates by cocultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum* // Appl. Environ. Microbiol.—1981.—41, N 6.—P. 1337—1343.
26. Pfennig N., Lippert K. D. Über das vitamin B<sub>12</sub>-bedürfnis phototropher schwefelbakterien // Arch. Mikrobiol.—1966.—55.—P. 245—256.
27. Wiegel J., Ljungdahl L. G., Rawson J. R. Isolation from soil and properties of the extreme thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum* // J. Bacteriol.—1979.—138.—P. 800—810.
28. Wiegel J., Kuk S. V., Kohring G. V. *Clostridium thermobutyricum* sp. nov., a moderate thermophile isolated from a cellulolytic culture, that produces butyrate as the major product // Int. J. Syst. Bacteriol.—1989.—39, N 2.—P. 199—204.
29. Wolin E. A., Wolin M. I., Wolfe R. S. Formation of methane by bacterial extracts // J. Biol. Chem.—1963.—238, N 8.—P. 2882—2886.
30. Yanling H., Yanfang D., Yanguan L. Two cellulolytic *Clostridium* species: *Clostridium cellulosi* sp. nov., and *Clostridium cellulofementans* sp. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol.—1991.—41, N 2.—P. 306—309.
31. Zeikus J. G., Wolfe R. S. *Methanobacterium thermoautotrophicum* sp. nov., an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile // J. Bacteriol.—1972.—109, N 2.—P. 707—713.
32. Zeikus J. G. Thermophilic bacterial: ecology, physiology and technology // Enzyme. Microbiol. Technol.—1979.—Vol. 1.—P. 243—352.
33. Zinder S. H., Mah R. A. Isolation and characterization of a thermophilic strain of *Methanosarcina* unable to use H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> for methanogenesis // Appl. Environ. Microbiol.—1979.—38, N 5.—P. 996—1008.
34. Zinder S. H., Sowers K. S., Ferry J. G. *Methanosarcina thermophila* sp. nov., a thermophilic, acetotrophic, methane-producing bacterium // Int. J. Syst. Bacteriol.—1985.—35, N 4.—P. 522—523.

Рецензент Т. П. Касаткіна  
Член редколегії В. С. Підгорський

Одержано 21.10.92

УДК 579.83.577.15

С. З. Ситайло, И. Г. Скрипаль, В. В. Бабичев

Ин-т микробиологии и вирусологии АН Украины, Киев

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДНК-АЗЫ *MYCOPLASMA FERMENTANS* PG-18

Определены физико-химические свойства и полипептидная структура ДНК-азы *Mycoplasma fermentans* PG-18. Фермент в нативном состоянии, по-видимому, существует в виде декамера, проявляет максимальную активность в слабощелочной области pH. Температурный оптимум — 37°C. ДНК-аза является Mg<sup>2+</sup>-зависимой и наиболее активна в присутствии 10 мМ MgCl<sub>2</sub>. ЭДТА полностью ингибирует активность ДНК-азы. Установлено, что данная ДНК-аза расщепляет фосфодиэфирную связь в 3'-положении дезоксирибозы и обладает экзо- и эндонуклеазной активностью, так как гидролизует как нативную линейную двуцепочечную, так и кольцевую замкнутую ДНК.

*Ключевые слова:* молликуты, микоплазма, ДНК-аза

Клетки молликутов, являясь естественными протопластами, могут легко подвергаться трансформации чужеродными нуклеиновыми кислотами (НК). Для защиты от такой трансформации и обеспечения стабильности генома у них имеется развитая нуклеазная система (ДНК-азная и РНК-азная), которая, разрушая чужеродные НК, снабжает клетку молликута материалом для синтеза собственных НК и РНК [2].

Известно, что *Mycoplasma fermentans* способствует заболеванию СПИДом ВИЧ-инфицированных людей [13], активизирует репродукцию вируса, выступая в этом процессе своеобразным кофактором [7], механизм действия которого до сих пор неизвестен. Возможно, нуклеазы

© С. З. Ситайло, И. Г. Скрипаль, В. В. Бабичев, 1993