

ЛИПОГЕНЕЗ УГЛЕВОДОРОД ДЕГРАДИРУЮЩЕЙ БАКТЕРИИ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* GH

Атакишиева Я.Ю., Исмаилова Л.М.

Институт Микробиологии НАН Азербайджана, г. Баку, Азербайджан,
y.atakishiyeva@mail.ru

Одной из эколого-трофических групп, ведущих окисление природных и антропогенных углеводов и таким образом участвующих в биогеохимических процессах биосферы, являются бактерии рода *Rhodococcus*, принадлежащие к актиномицетно-нокардиоформной линии эволюции прокариот [5]. Они постоянные и доминирующие компоненты естественного биоценоза нефтяных загрязнений. Синтезируемая ими ферментная система обладает широкой субстратной специфичностью и катализирует реакции биотрансформации практически всех классов органических соединений. Состав и метаболизм клеточных липидов влияет на адаптацию этих микроорганизмов к неблагоприятным факторам [2] и изменяется в ходе развития клеток. Поверхностная активность и гидрофобный характер способствуют взаимодействию между микроорганизмами и нерастворимым субстратом, что дает возможность преодолеть ограниченную диффузию при его транспорте в клетку.

Целью настоящей работы явилось исследование изменения липидного состава клеток *R. erythropolis* в процессе роста в среде с углеводородным субстратом.

Объектом исследования служил штамм *Rhodococcus erythropolis* GH выделенный нами из нефтезагрязненных почв Абшерона (Азербайджан).

Для выделения углеводородокисляющих бактерий 1 г почвы, отобранной из природных образцов нефтезагрязненных почв Апшерона, использовали для приготовления разведений в стерильной воде, из которых производили высев в пробирки с 9 мл среды, содержащей в г/л дистиллированной воды: KNO_3 – 4,0; KH_2PO_4 – 0,6; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 1,4; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8. Начальный pH среды 7,0 - 7,2.

В данной среде единственным источником углерода служил гексадекан (2,0%). Гексадекан предварительно стерилизовали и вносили в среду непосредственно перед посевом. Для получения изолированных колоний углеводородокисляющих бактерий применяли 10-кратные разведения культуры в физиологическом растворе с последующим рассевом на агаризованные среды на чашках Петри.

Посевы инкубировали при 28°C-30°C. Изолированные культуры хранили в холодильнике. Идентификацию выделенных бактерий проводили с использованием методов, предложенных в определителе бактерий Берги и в монографии О.А. Нестеренко и соавт. [1, 3].

Чистоту культур проверяли под микроскопом, визуально и рассевом на плотные среды.

Липиды из биомассы экстрагировали и очищали по Блай и Дайера [4]. Разделение липидов на фракции производили методом ТСХ на силикагеле.

Жирнокислотный состав бактериальных липидов определяли с помощью газожидкостной хроматографии. Липидная фракция выделена из культуры экстракцией смесью хлороформ : н-гексан (1:1). Полученный экстракт подвергали метилированию.

Для сравнения результатов анализов использовали вышеуказанную среду с глюкозой в концентрации 4,0%. Было показано, что содержание общих липидов *R. erythropolis* GH, выращенных на минеральной среде с глюкозой составляет 2,6-2,9% на вес сухой биомассы. При росте исследованных бактерий на среде с гексадеканом, содержание суммарных липидов достигает 7,2-7,4%, что в 2,4 раза больше по сравнению с содержанием при выращивании на глюкозной среде (рисунок). При этом выход биомассы был на 38% ниже с добавлением гексадекана.

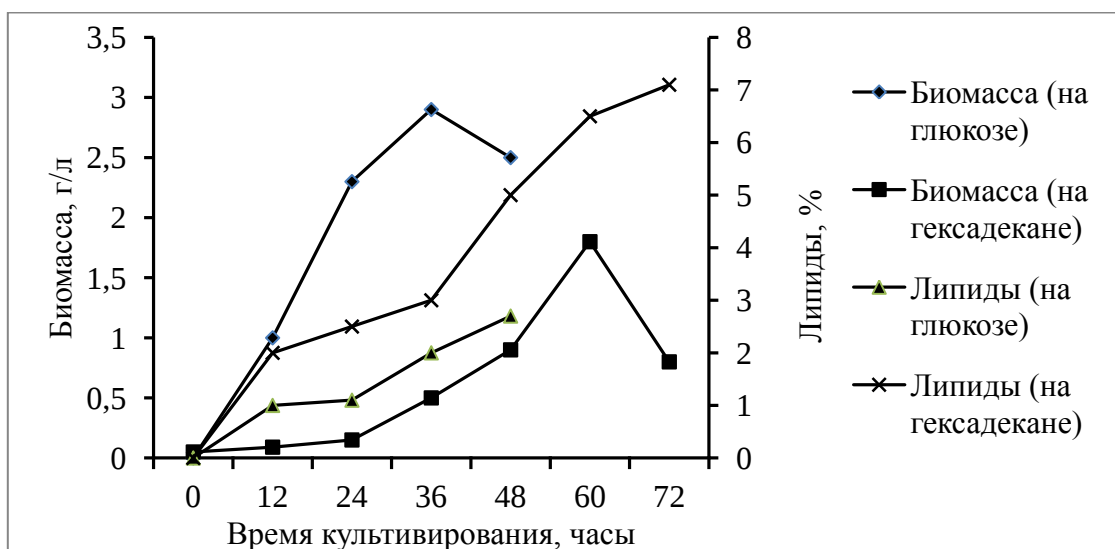


Рисунок – Динамика накопления липидов в процессе роста *Rhodococcus erythropolis* GH на среде с глюкозой и гексадеканом.

При исследовании процесса синтеза липидов отмечалось существенное различие в динамике накопления отдельных фракций. Фракционный состав липидов 48-часовой культуры характеризовался высоким содержанием фосфолипидов. В последующие часы количество полярных липидов уменьшалось и при переходе в стационарную фазу роста с возрастанием содержания липидов в биомассе увеличивалась доля триацилглицеринов до 75,0% от суммы липидов. Как правило, возрастает доля тех липидных соединений, которые выполняют роль запасных энергетических материалов и снижается относительная доля полярных липидов.

Полученные в опытах минимальные и максимальные значения величин содержания индивидуальных жирных кислот в составе суммарных экстрагируемых липидов в динамике развития испытанной бактерии на двух субстратах приведены в таблице.

Таблица – Состав жирных кислот (%) в суммарных экстрагируемых липидах в динамике развития *Rhodococcus erythropolis* GH на глюкозе и гексадекане.

Жирные кислоты	Глюкоза (4,0%)			Гексадекан (2,0%)			
	0	24	48	0	24	48	72
C10:0	-	-	-	0	-	4,8	4,2
C12:0	-	-	-	0	-	0,6	0,7
C14:0	1,7	2,0	1,6	1,1	4,0	4,2	4,0
C16:0	36,2	38,5	35,6	54,0	46,0	31,5	31,5
C16:1	5,7	5,0	4,5	37,2	45,8	51,2	51,3
C17:0	32,8	22,9	22,4	3,5	—	—	—
C17:1	9,2	15,1	16,5	—	—	—	—
C18:0	4,5	2,8	3,8	—	—	2,6	2,4
C18:1	9,9	13,7	15,6	4,2	4,2	5,1	5,9

Как видно из таблицы липиды различаются количественным содержанием жирных кислот, однако специфичности в составе кислот не обнаруживается. В липиде, полученном в среде с глюкозой выявлены жирные кислоты с длиной цепи от 14 до 18 углеродных атомов, с преобладанием гекса- (C16:0) и гептадекановой (C17:0) кислот. Содержание насыщенных жирных кислот в глюкозной среде после 48-часовой инкубации составляло около 63,3% от общего количества жирных кислот.

При росте *R. erythropolis* GH на среде с углеводородом в составе жирных кислот полных липидов отмечается повышенное по сравнению с контролем содержание пальмитолеиновой кислоты (C16:1).

Резкие изменения в содержании и составе жирных кислот полярных липидов наблюдался при перенесении культуры на среду с гексадеканом.

В этих условиях содержание непредельных кислот в составе полярных липидов достигает 70,5%. Длины ацильных цепей наблюдаемых жирных кислот находились в диапазоне от C14 до C18. C16 и C18 жирные кислоты, как правило, были основными жирными кислотами независимо от источника углерода. По сравнению с клетками, выращенными на глюкозе, в клетках, выращенных на гексадекане, было обнаружено относительно небольшое количество жирных кислот C18:1, и относительно высокое количество жирных кислот C14:1 и C16:1.

В составе полярных липидов в обоих вариантах обнаружены преимущественно ненасыщенные жирные кислоты. Среди них – 16:1, 17:1 и 18:1. Однако степень ненасыщенности фосфолипидов двух культур, резко

различающихся по степени ненасыщенности суммарных липидов идентична (суммарное содержание ненасыщенных жирных кислот липидов).

Степень ненасыщенности нейтральных липидов двух культур, резко различающихся по степени ненасыщенности суммарных липидов, идентична (суммарное содержание ненасыщенных жирных кислот липидов). В составе нейтральных липидов в обоих вариантах обнаружены преимущественно С16 и С17 насыщенные жирные кислоты (56,5%). Октадеценовая кислота являлась основной моноеновой жирной кислотой.

Таким образом, значительные различия бактерий *Rhodococcus erythropolis* GH, выращенных на гидрофобном и гидрофильном субстратах, по жирнокислотному составу и степени ненасыщенности синтезируемых липидов предполагают различия в активности соответствующих ферментных систем, ответственных за их биосинтез.

Полученные результаты способствуют улучшению понимания процесса метаболизма липидов в *Rhodococcus* sp. и открывают новые возможности для использования *R. erythropolis* GH в получении липидов с содержанием жирных кислот пригодных для промышленного применения.

Литература

1. Краткий определитель бактерий Берги. Под ред. Дж. Хоулта: Пер с англ. М. 1980. 495 с.
2. Куюкина М.С., И. Б. Ившина, М.И. Рычкова, О.Б. Чумаков Влияние состава клеточных липидов на формирование неспецифической антибиотикорезистентности алканотрофных родококков // Микробиология. 2000. Т.69. №1. С. 62-69.
3. Нестеренко О.А., Квасников Е.И., Ногина Т.М. Нокардиоподобные и коринеподобные бактерии. Киев. 1985. 334 с.
4. Bligh, E.G., Dyer, W.J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification // Can. J. Biochem. Physiol. 1959. V. 37. P. 911–917.
5. Brzeszcz Joanna, Paweł Kaszycki. Aerobic bacteria degrading both *n*-alkanes and aromatic hydrocarbons: an undervalued strategy for metabolic diversity and flexibility // Biodegradation. Biodegradation. 2018. V. 29. P. 359–407.