

ЗАКОНОМЕРНОСТИ РОСТА ARTHROBACTER SIMPLEX 343 НА СРЕДЕ, СОДЕРЖАЩЕЙ ЭТАНОЛ

Бактерии рода *Arthrobacter* Conn et Dammick привлекают к себе внимание многих исследователей, так как соответствуют основным критериям отбора микроорганизмов для их использования в микробиологической промышленности.

Артробактерии продуцируют аминокислоты, витамины, другие биологически активные вещества. Для целей биосинтеза в качестве источника углерода и энергии применяют углеводороды, органические кислоты, спирты (метанол, этанол). Использование этанола позволяет получать микробную биомассу высокого качества.

В связи с перспективой широкомасштабного производства микробной биомассы на этаноле необходимо развитие дальнейших исследований ростовых особенностей артробактерий, поиски среди них видов, максимально отвечающих запросам биотехнологических производств.

Целью настоящей работы явилось изучение закономерностей роста и определение ценных для производства ростовых параметров *Arthrobacter simplex* 343 при культивировании на минеральной среде с этанолом.

Материал и методика

В работе использован штамм *Arthrobacter simplex* 343, выделенный из сточных вод и идентифицированный в соответствии с [1, 2].

Минеральная среда для выращивания культуры готовилась по прописи [3]. Штамм инкубировали в 250-миллилитровых колбах с 50 мл среды на качалках (120 кач./мин) при 28 °C 48 ч. Объем посевной культуры составлял 5 % засеваемого объема среды.

Построение кривых роста и определение параметров роста: удельной скорости роста (μ , ч⁻¹), экономического коэффициента (Y , %), времени генерации (g , ч), продуктивности по биомассе (P , г/л·ч) проводили аналогично [4]. С целью получения статистически достоверных данных при вычислении удельной скорости роста пользовались методом наименьших квадратов [5]. Концентрацию биомассы (X , г/л) определяли весовым методом [6], белок биомассы — методом Лоури [7]. Содержание белка в испытуемой пробе устанавливали по калибровочной кривой для бычьего альбумина и выражали в процентах от количества сухой биомассы. Аминокислотный состав белка исследовали на автоматическом аминокислотном анализаторе «Микротехма» ААА-881 (Прага). Содержание аминокислот выражали в процентах от количества истинного белка в том же образце. Количество этанола в культуральной жидкости определяли по методу, описанному в [8], а алкогольдегидрогеназную активность исследуемой культуры — по методу [9].

!

Результаты и их обсуждение

Изучение роста и развития микробной популяции необходимо для определения промышленной ценности микроорганизмов. Особый интерес представляет исследование прироста клеток и потребления ими лимитирующего субстрата, что позволяет рассматривать влияние режима культивирования не только на производительность ферментера, но и на технологические характеристики процесса ферментации [10]. Мы определяли накопление биомассы и расходование субстрата при росте *Arthrobacter simplex* 343 на минеральной среде с различными концентрациями этанола.

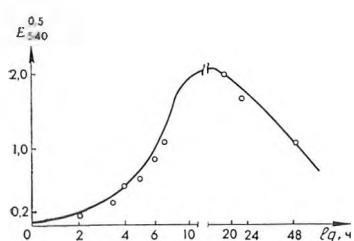


Рис. 1. Кривая роста *Arthrobacter simplex* 343

Кривая роста *Arthrobacter simplex* 343 имеет характерную для многих микроорганизмов *S*-образную форму, где различимы лаг-фаза, фаза ускорения роста, экспоненциальная замедленного роста и стационарная фазы, а также фаза гибели популяции. Цикл развития *Arthrobacter simplex* 343 на минеральной среде с этанолом в качестве единственного источника углерода и энергии завершается к 48 ч (рис. 1).

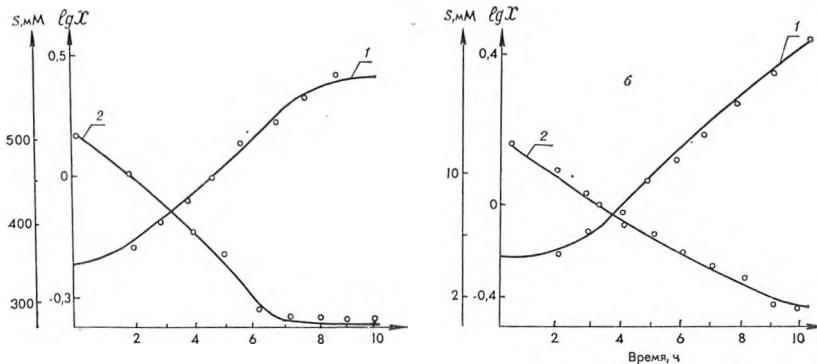


Рис. 2. Характер роста *Arthrobacter simplex* 343 на среде с исходной концентрацией этанола 530 (а) и 13 мМ (б):

1 — концентрация клеток; 2 — концентрация субстрата

С возрастанием исходной концентрации этанола в среде (от 5 до 500 мМ) все фазы развития культуры растягиваются во времени. Так, лаг-фаза увеличивается с 1 (5 мМ этанола) до 2—2,5 ч (500 мМ этанола). При низких концентрациях лимитирующего рост субстрата (например, 10 мМ) культура переходит в стационарную фазу развития уже после 7 ч, что совпадает с исчерпанием субстрата. При высоких концентрациях этанола (например, 500 мМ) *Arthrobacter simplex* 343 находится в экспоненциальной фазе более 10 ч (в среде содержится еще значительное количество этанола) (рис. 2).

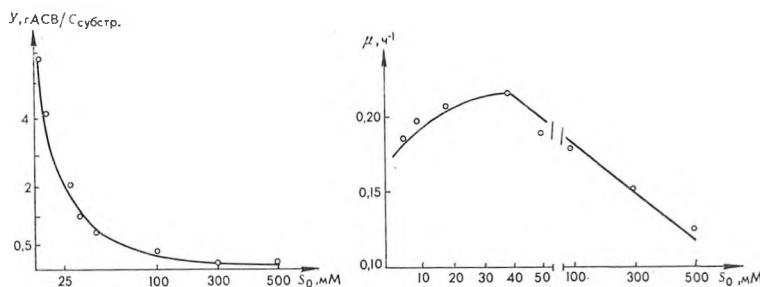


Рис. 3. Зависимость экономического коэффициента от исходной концентрации этанола в питательной среде

Рис. 4. Зависимость удельной скорости роста от начальных концентраций субстрата

Важнейшим физиологическим и технологическим показателем роста микроорганизмов является значение экономического коэффициента. На всем протяжении культивирования *Arthrobacter simplex* 343 (после лаг-фазы) поглощение субстрата и прирост биомассы связаны линейно, а абсолютное значение экономического коэффициента снижается с увеличением исходной концентрации этанола в среде (рис. 3).

Зависимость удельной скорости роста *Arthrobacter simplex* 343 от исходной концентрации этанола в пределах от 5 до 50 мМ описывается

уравнением Моно: $\mu = \mu_{\max} S / (K_s + S)$. При более высоких концентрациях наблюдается угнетение роста *Arthrobacter simplex* 343 (рис. 4), которое можно учесть введением в знаменатель квадратичного члена: $\mu = \mu_{\max} S / (K_s + S + S^2 / K_i)$.

Графическая интерпретация экспериментов с применением известного метода линеаризации [4] позволила найти максимальную скорость роста ($\mu_{\max} = 0,22 \text{ ч}^{-1}$), константу насыщения ($K_s = 0,95 \cdot 10^{-3} \text{ М}$) и константу ингибирования ($K_i = 0,78 \text{ М}$).

С целью количественной характеристики роста в экспоненциальной фазе развития культуры (при концентрации этанола 40 мМ) определены: экономический коэффициент ($Y = 67 \%$), время генерации ($g = 3,15 \text{ ч}$), продуктивность по биомассе ($P = 0,27 \text{ г/л.ч}$), удельная активность алкогольдегидрогеназы — ключевого фермента метаболизма этанола ($\text{АДГ} = 0,06 \text{ ед./мг белка}$). Определены также содержание белка в биомассе (62,5 % от сухой массы) и ее аминокислотный состав (см. таблицу).

Аминокислотный состав белка *Arthrobacter simplex* 343,
выращенного на минеральной среде с этанолом

Аминокислоты	Содержание аминокислот, % от истинного белка	Состав незаменимых аминокислот в белке, рекомендуемый ФАО при ООН
Лизин	5,09	4,2
Гистидин	1,63	
Аргинин	5,3	
Аспарагиновая кислота	11,21	
Тreonин	4,33	2,8
Серин	4,67	
Глутаминовая кислота	20,48	
Пролин	3,23	
Глицин	4,77	
Аланин	12,36	
Валин	6,26	4,2
Метионин	4,9	2,2
Изолейцин	3,0	4,2
Лейцин	8,7	4,8
Тирозин	3,23	2,8
Фенилаланин	4,6	2,8

Примечание: истинный белок — это суммарное количество аминокислот в испытуемом образце.

Исследуемая культура содержит хорошо сбалансированный состав аминокислот. Количественное содержание аминокислот отвечает требованиям эталона ФАО (организация по вопросам продовольствия и сельского хозяйства при ООН), а количество треонина, валина, метионина, лейцина и фенилаланина превосходит эталон ФАО примерно в 1,5—2 раза [11].

Таким образом, *Arthrobacter simplex* 343 при культивировании на минеральной среде с этанолом имеет характерные для многих микроорганизмов закономерности роста. Абсолютные значения ростовых параметров *Arthrobacter simplex* 343 близки к таковым некоторых этанолусваивающих микроорганизмов [10, 12]. Удельная скорость роста и экономический коэффициент *Arthrobacter simplex* 343 определяются начальной

концентрацией лимитирующего компонента питания (этанола), т. е. с увеличением его исходной концентрации уменьшаются.

Биомасса *Arthrobacter simplex* 343 содержит значительное количество белка и хорошо сбалансирована по аминокислотному составу. Она может служить источником получения как отдельных аминокислот, так и их смеси.

Представленные исследования закономерностей роста *Arthrobacter simplex* 343 на минеральной среде с этанолом ранее в литературе не описаны и, следовательно, являются новыми.

Список литературы

1. Квасников Е. И., Писарчук Е. Н., Нестеренко О. А. // Успехи микробиол. М., 1977. С. 136.
2. Краткий определитель бактерий Берги / Под ред. Дж. Хоулта. М., 1980. С. 319.
3. Горнак Н. М., Коваленко С. П., Идельчик И. М., Замбржицкий О. Н. // Прикладн. биохим. и микробиол. 1979. Т. 15. Вып. 3. С. 246.
4. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М., 1978. С. 15.
5. Плохинский Н. А. Биометрия. М., 1970. С. 227.
6. Пименова М. Н., Гречушкина Н. Н., Азова Л. Г. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М., 1971. С. 138.
7. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. // Journ. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265.
8. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1980. С. 179.
9. Leskovac V., Rakov-Pericin D. // Biochem. Journ. 1975. V. 145. № 3. P. 581.
10. Никонова Е. С., Манаков М. Н. // Прикладн. биохим. и микробиол. 1984. Т. 20. Вып. 5. С. 675.
11. Потребности в белке. Докл. объединен. эксперт. группы ФАО/ВОЗ: Сер. техн. докл. ВОЗ. 1966. № 301. С. 44.
12. Коваленко С. П. Химические факторы в селекции продуцентов микробных белков. Минск, 1980. С. 135.

УДК 595.76.768.25+599.322.3

А. Д. ПИСАНЕНКО

РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ЧИСЛЕННОСТЬ *Platypsyllus castoris* Rits. (Platypsyllidae, Coleoptera) — ЭКТОПАРАЗИТА ЕВРОПЕЙСКОГО БОБРА НА ТЕРРИТОРИИ БССР

Среди представителей многочисленного отряда жесткокрылых, освоивших самые разнообразные пищевые субстраты, лишь немногие виды жуков, в основном семейств Leptinidae и Platypsyllidae, обитают на поверхности тела млекопитающих. Это, в частности, *Platypsyllus castoris* Rits., тесно связанный с кожными покровами грызунов рода *Castor* L. (Castoridae, Rodentia). Обитая в подпушни бобров, *P. castoris* в процессе эволюции приобрел черты глубокой конвергенции с блохами и при описании [1] был ошибочно отнесен к этому отряду.

Статус *P. castoris* как типичного эктопаразита длительное время подвергался сомнению [2, 3]. Отсутствие данных по биологии и экологии этого вида явились, вероятно, результатом того, что бобровые популяции в большинстве стран Европы и Сев. Америке находились на грани исчезновения, и не всегда имелась возможность вести сбор материала непосредственно в местах обитания довольно редкого вида млекопитающих. Благодаря активным охранным мероприятиям численность бобров значительно возросла, и к настоящему времени появились реальные условия для исследований их паразитов. Роль в системе биоценотических связей бобра и некоторые черты биологии *P. castoris* выяснены лишь недавно [4, 5]. Изучение жизненного цикла развития эктопаразита позволило установить, что личинка его является типичным паразитом, а сожительство взрослого насекомого носит черты комменсализма [6].