

**Ю. Р. Малащенко, В. А. Романовская, И. Г. Соколов,
Т. А. Гринберг, Т. П. Пирог, Ф. В. Мучник**

Ин-т микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев

БИОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ, АССИМИЛИРУЮЩИХ C₁—C₂-СОЕДИНЕНИЯ, И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

В статье отражены основные направления фундаментальных исследований отдела биологии газоокисляющих микроорганизмов — экология, селекция, таксономия, физиология, биохимия, генетика бактерий, использующих C₁—C₂-соединения, математическое моделирование микробиологических процессов, а также прикладных — разработка научных основ биотехнологий синтеза практически ценных продуктов (белка, экзополисахаридов, кормовых добавок, биогаза) на основе непищевых субстратов, поиск залежей углеводородного сырья, защита окружающей среды.

Ключевые слова: метанотрофы, метилотрофы, метаногены, экология, таксономия, метаболизм, генетика, биогаз, этаполан, математические модели, биотехнология

Особенности биологии метилотрофных бактерий

Экология. На сегодняшний день исследования, касающиеся круговорота метана в биосфере, чрезвычайно актуальны. Это обусловлено возрастанием в атмосфере концентрации метана антропогенного происхождения за последние 200 лет более чем на 100 % (от 0,7 до 1,7 ppm) и, как следствие этого, изменением гомеостаза земной атмосферы. Показано, что сток метана из атмосферы осуществляют облигатные метаноокисляющие бактерии (метанотрофы). Проведены широкие обследования экосистем с целью определения природных мест обитания метанотрофов и оценки их роли в биосферных процессах [16, 22]. Исследованы свыше 5000 проб из различных географических зон и экосистем, характеризующихся различными геохимическими условиями (степные, лесные и богарные почвы, рисовые чеки, почвы нефтегазовых и газовых месторождений; вода и ил пресных естественных и искусственных водоемов; вода равнинных и горных рек, воды и породы угольных шахт, воды и осадки морей, ил сточных вод и т. д.) [4, 9, 52]. Выделены штаммы метанотрофов, отнесенные к мезофильным, термофильным, психрофильным и галофильным формам. Обследование морских вод, осадков шельфа и абиссальных глубин осуществлялось с использованием научно-исследовательских судов “Академик Вернадский”, “Артемиды”, “Профессор Водяницкий”, малой субмарины “Бентос”.

Изучена активность микробного стока метана в гипергалинных экосистемах Крыма (содержание NaCl 50—253 г/л). Из осадков гипергалинных озер

изолированы экстремальные галофильные метанотрофы, которые окисляют метан при наличии 100 г NaCl в 1 л среды. Высокое количество метанотрофов обнаружено в воде и осадках умеренно соленых водоемов.

Наряду с мезофильными бактериями выявлены и описаны термофильные формы, окисляющие метан при температуре 55—60 °С. Следует указать, что если мезофильные метанотрофы впервые были выделены в 1906 г., то факт существования термофильных метанотрофов стал известен лишь спустя 70 лет [8, 9, 56].

Окисление метана — высокоэнергетический процесс. Энергия, освобождаемая при микробном окислении метана, частично расходуется на биосинтетические нужды клетки, но при этом определенное количество энергии рассеивается в виде тепла. Интенсивность бактериального окисления метана в природных условиях позволила зафиксировать локальный разогрев (Δt) над нефтегазовыми залежами суши и океанов. Обнаруженное явление охарактеризовано как биогеохимический реактор [7]. Его топография на земной поверхности может фиксироваться контактно на местности, а также дистанционно — с самолетов, вертолетов, космических аппаратов. Эти исследования стали основой для разработки нового метода поиска углеводородов.

На континентальном шельфе и за его пределами определены места повышенной биологической активности — коралловые острова, барьерные рифы, атоллы, мидиевые и устричные банки. К этим местам практически не поступают минеральные и органические вещества, однако там имеет место лавинообразное накопление карбоната кальция в виде рифогенных осадков. В основе карбонатообразования и роста каркасных организмов лежат не только продукты фотосинтеза, но и мощные источники хемоорганотрофного биосинтеза. Субстратом здесь служат органические вещества, образуемые метанотрофами, которые используют продукты углеводородной дегазации океанической коры, находящиеся в зоне биогеохимических реакторов мирового океана.

Метан потребляется метанотрофами во всей аэробной зоне. Полученные результаты показали, что бактериальное окисление метана в почвах, как и в водоемах, — широко распространенное явление. Микроорганизмы, растущие на метане, могут существовать в различных экологических зонах с разнообразными геохимическими условиями местности [59]. Они обладают высокими адаптационными способностями, окисляют метан в широком диапазоне температур (от 0 до +65 °С) и pH (5,0—9,0), фиксируют молекулярный азот, не нуждаются в стимуляторах роста, используют минеральные соединения в качестве источников биогенных элементов. Все вещества, необходимые для их роста, могут быть соединениями абиогенного происхождения. Таким образом, метанотрофы являются важными компонентами почвенных экосистем, активно участвующими в процессах трансформации углерода и азота [54]. Более того, почвенные и водные метанотрофы, окисляя метан, предотвращают его эмиссию в атмосферу Земли, являясь своеобразным бактериальным щитом, препятствующим повышению концентрации метана в атмосфере. Они являются единственными каталитическими системами, акцептирующими метан биологического и геохимического происхождения и трансформирующими это C_1 -соединение в сложные органические вещества. Обеспечивая трансформацию метана в органические соединения, метанотрофы поддерживают равновесие между процессами синтеза метана и его окислением. Благо-

даря их синтетической деятельности в биосферный круговорот углерода возвращается более $7,5 \cdot 10^8$ т органического углерода в год. Ассимилируя биологический, фосильный, а также абиогенный метан, метанотрофы способствуют увеличению общих запасов органического вещества биосферы.

С целью прогнозирования активности биологических процессов, обусловленных стоком атмосферных газов, были созданы математические модели для определения возможных направлений протекания исследуемых процессов. Методами математического моделирования исследован процесс диффузионного распространения и микробного потребления растворенных атмосферных газов в поверхностных слоях мирового океана. Математическая модель процесса диффузии и микробного потребления газообразных субстратов в поверхностном слое водоема представляет собой начально-краевую задачу для уравнения в частных производных второго порядка параболического типа [20–22, 57].

В результате аналитического решения этой задачи для стационарного процесса получены математические модели (1) при $V = \text{const}$ и (2) при $V = \alpha S(X)$, характеризующие микробный сток атмосферных газов в водную фазу [22]:

$$V = 2D [X_1 S(X) + S_0 (X - X_1)] X_1^{-1} (X^2 - XX_1)^{-1}, \quad (1)$$

$$V = \alpha S_0 \left[\operatorname{ch} \left(X \sqrt{\frac{\alpha}{D}} \right) - \operatorname{cth} \left(X_1 \sqrt{\frac{\alpha}{D}} \right) \operatorname{sh} \left(X \sqrt{\frac{\alpha}{D}} \right) \right], \quad (2)$$

где V — скорость микробного потребления растворенного в воде атмосферного газа; D — коэффициент диффузии растворенного газа; X — текущая координата; X_1 — граница распространения субстрата; $S(X)$ — концентрация растворенного в воде газа; S_0 — концентрация растворенного газа у поверхности водной экониши; $\alpha = \text{const} > 0$.

Промоделированы также некоторые кинетические закономерности процессов диффузии метана в глубинном осадке, гипolimнионе, металимнионе и эпилимнионе водоемов [22].

Изучена эпифитная метилотрофная микрофлора в различных регионах Украины. Показано, что розовоокрашенные факультативные метилотрофные бактерии (РОФМ-бактерии) количественно преобладают на листьях растений и являются постоянными обитателями филлосферы лекарственных, сельскохозяйственных, декоративных и диких растений. Они найдены также в почвах и иле водоемов. Не выявлена видовая специфичность РОФМ-бактерий к растению-хозяину, а также приуроченность РОФМ-бактерий к различным регионам в пределах Украины. Стабильное существование РОФМ-бактерий в филлосфере растений обеспечивается их питательными потребностями (ассимилируют экзометаболиты растений, в том числе метанол), а также устойчивостью к УФ-облучению, низкой влажности и высокой температуре. Повсеместное распространение РОФМ-бактерий в филлосфере растений свидетельствует об их симбиотических отношениях.

Таксономия. На основании изучения морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств метанотрофов (в частности, облигатность по отношению к источнику углеродного питания [5, 6, 10], ассимиляция экзоген-

ной углекислоты [36], фиксация атмосферного азота [60], сопряженность органотрофного и литотрофного метаболизма [38], наличие гидроксиламиноксидазы [45], путь метаболизма метана [19], жирнокислотный состав клеток [37]) проведена их идентификация [32, 35, 37]. Описаны 7 новых видов метанотрофов [32]. Создана коллекция метаниспользующих бактерий — *Methylococcus capsulatus*, *M. thermophilus*, *Methylobacter ucrainicus*, *M. luteus*, *M. whittenburyi*, *Methylomonas methanica*, *M. rubra*, *Methylosinus trichosporium*, *M. sporium*, *Methylocystis parvus*, *M. echinoides*, изолированных из различных экосистем. Коллекционные штаммы гарантированно поддерживаются в коллекции микроорганизмов ИМВ НАН Украины. Согласно Международным стандартам систематизированы номенклатурные данные о коллекционных штаммах метилотрофных бактерий [34, 39]. Составлены информационные карты WFCC для коллекционных штаммов и штаммов — продуцентов биологически активных веществ, а также каталог коллекционных штаммов метилотрофных бактерий. Предложены принципы классификации метилотрофных бактерий [41].

В связи с тем что в существующих определителях бактерий приведены диагнозы лишь двух видов метанотрофов, разработана классификация этой группы бактерий [32, 33, 41, 64]. Предполагалось, что таксономически метанокисляющие бактерии представляют единую группу. Однако на основании анализа нуклеотидных последовательностей 16S рРНК по последним данным литературы установлено, что эволюционно метанотрофы представляют две ветви класса *Proteobacteria*: *Methylosinus*, *Methylocystis* (α -подгруппа) и *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylobacter* (γ -подгруппа). Наши результаты анализа нуклеотидных последовательностей 5S рРНК, а также электрофоретического анализа клеточных белков штаммов, имеющих в коллекции отдела биологии газоокисляющих микроорганизмов, показали, что филогенетически метанокисляющие бактерии представляют более разнообразную группу, чем предполагалось ранее [41, 64].

Роды метанокисляющих бактерий по ряду признаков (нуклеотидные последовательности 5S и 16S рРНК, путь метаболизма C_1 -соединений, тип ВЦМ, состав жирных кислот, чувствительность к литическим ферментам) четко делятся на две группы [64]. Целесообразно разделить семейство *Methylococcaceae* на два семейства: *Methylococcaceae* и *Methylosinaceae*.

Все исследованные штаммы РОФМ-бактерий, изолированные нами с поверхности листьев растений, отнесены к роду *Methylobacterium*. В настоящее время описано 8 видов рода *Methylobacterium*. Однако некоторые из них выделены в самостоятельные виды только на основании ДНК — ДНК-гибридизации и исследования состава оснований ДНК, поскольку фенотипически они неотличимы. Некоторые отличия между ними обнаружены только относительно ассимиляции источников углеродного питания, что позволяет причислить изолированные штаммы к видам *Methylobacterium extorquens*, *M. mesophilicum* и *M. fujisawaense*. Несколько штаммов изученных РОФМ-бактерий не представляется возможным отнести к известным видам рода. Не исключено, что они будут выделены в самостоятельные виды.

Предложена следующая схема классификации метилотрофных бактерий [64], основанная на результатах собственных исследований и данных литературы.

1. облигатные метаноокисляющие бактерии*

Семейство "*Methylococcaceae*"

Род I. *Methylococcus*: *M. capsulatus*, *M. thermophilus*

Род II. *Methylomonas*: *M. methanica* ("*Methanomonas methanica*", "*Pseudomonas methanica*"), "*M. rubra*", *M. fodinarum*, *M. aurantiaca*

Род III. *Methylobacter*: *M. luteus* ("*Methylococcus luteus*"), *M. whittenburyi* ("*Methylococcus whittenburyi*", "*Methylobacter capsulatus*"), *M. agilis*, *M. albus* ("*Methylomonas alba*"), *M. marinus*, *M. pelagicus* ("*Methylomonas pelagica*"), "*M. ucrainicus*", ("*Methylococcus ucrainicus*")

Семейство "*Methylosinaceae*"

Род IV. *Methylosinus*: *M. trichosporium*, *M. sporium*

Род V. *Methylocystis*: *M. parvus*, *M. echinoides*

2. облигатные и ограниченно факультативные метанолиспользующие бактерии

Семейство "*Methylobacillaceae*"

Род I. *Methylobacillus*: *M. glycogenes*, ("*Pseudomonas insueta*", "*Methylomonas methanolica*", "*Methylomonas methylovora*", "*Methanomonas methylovora*", "*Methanomonas methanolica*", "*Pseudomonas methanolica*")

Род II. *Methylophaga*: *M. marina*, *M. thalassica* ("*Alteromonas thalasso-methanolica*", "*Methylomonas thalassica*")

Род III. *Methylophilus*: *M. methylophilus* ("*Pseudomonas methylophilus*", "*Methylomonas clara*")

3. Факультативные метанолиспользующие бактерии (только розовоокрашенные)

Род I. *Methylobacterium*: *M. organophilum*, *M. rhodium* ("*Pseudomonas rhodos*"), *M. radiotolerans* ("*Pseudomonas radiata*"), *M. mesophilicum* ("*Pseudomonas mesophila*"), *M. extorquens* ("*Protomonas extorquens*", "*Bacillus extorquens*", "*Vibrio extorquens*", "*Pseudomonas extorquens*", "*Flavobacterium extorquens*"), *M. rhodezianum*, *M. zatmanii*, *M. fujisawaense*

Генетика. Еще 15 лет назад исследования по генетике метаноокисляющих бактерий практически не были представлены ни в отечественной, ни в мировой литературе. Нами проведен скрининг плазмид у метанотрофов. У ряда коллекционных штаммов выявлены криптические плазмиды с различной молекулярной массой [41]. Осуществлена передача конъюгативных плазмид из гетеротрофных бактерий в клетки двух штаммов метанотрофов [50]. Установлено, что эти плазмиды могут поддерживаться в клетках различных штаммов в автономном либо в интегрированном состоянии. Показано, что возможен перенос изучаемых плазмид из клеток метанотрофов в клетки *Escherichia coli*, причем в ряде случаев плазмиды несут сегменты хромосом метанотрофов. Впервые осуществлена внутривидовая передача хромосомальных генов у метанотрофов. Сконструирован банк генов *Methylococcus thermophilus* на мобилизуемом векторе с широким кругом бактерий-хозяев. Отобраны клоны с *rec A*-подобным геном метанотрофов, а также исследованы физико-химические свойства *rec A* гена. Дефектный *rec A* фенотип *E. coli* восстанавливался двумя различными сегментами хромосомы *Methylococcus thermophilus*. Вышеприведенные данные свидетельствуют о способности

*В кавычки взяты незаконные наименования таксонов.

метанотрофов осуществлять гомологическую рекомбинацию ДНК (аналогично другим видам прокариотов). Получен спектр спонтанных и индуцированных мутантов метанотрофов [40, 66]. Создана коллекция мутантов — продуцентов белка. Эти исследования являются базой для проведения генетического анализа метанотрофов, а также для конструирования продуцентов белка генноинженерными методами и создания экологически чистого производства белка на основе контролируемого состава маркированных штаммов.

Впервые у метанотрофов обнаружены эндонуклеазы рестрикции. Из 51 изученных штаммов (13 видов) выявлено 8 продуцентов эндонуклеаз рестрикции (3 вида), которые проявляют по меньшей мере три различные специфичности (Hpa I, Kpn I и неидентифицированный фермент) [65]. Продуценты эндонуклеаз рестрикции со специфичностью Kpn I (Asp 718) были изолированы из различных образцов воды и ила поймы реки Днепра.

Метаболизм. Метанотрофы окисляют метан через метанол, формальдегид и формиат. Ассимиляция углерода метана осуществляется на уровне формальдегида при функционировании рибулозомонофосфатного или серинового пути. Уникальной особенностью метанокисляющих бактерий является их способность синтезировать все углеродсодержащие клеточные компоненты из одноуглеродных соединений — метана или, в ряде случаев, метанола [14]. Многоуглеродные органические соединения не используются ими в качестве источников углерода, и, более того, многие из них подавляют рост метанотрофов. Сильными ингибиторами их роста являются некоторые аминокислоты [6, 23]. Показано, что метанотрофы — физиологически обособленная группа бактерий, которые облигатно зависят от метана как источника углеродного питания [5, 13, 36]. Проведен анализ концепций облигатной зависимости метанокисляющих бактерий от C_1 -источников углерода и энергии. Обнаруженные особенности энергетического метаболизма метанотрофов позволили заключить, что основной причиной их облигатности (по отношению к метану) является неспособность использовать восстановительные эквиваленты (НАДН), генерируемые при окислении многоуглеродных субстратов, для обеспечения метаболизма энергией, а также то, что терминальное акцептирование большей части электронов метаболизируемого субстрата (метана или метанола) происходит при функционировании первого фермента, окисляющего метан (метаномоноксигеназы) [49]. Таким образом, функционирование специализированных механизмов переноса энергетических эквивалентов, по-видимому, является основной причиной облигатности метанотрофов.

Процессы трансформации энергии метана при его метаболизме представляют особый интерес, поскольку у метанотрофов не функционируют обычные электронтранспортные цепи и сопряженные с ними энергогенераторы [17, 49]. Изучена возможность генерации энергии при транспорте электронов к метаномоноксигеназе (ММО). Показано, что при инактивации метанолдегидрогеназы (МДГ) и цитохромоксидазы гидроксиламином метан окисляется лишь сопряженно с дегидрированием формиата [46]. Сопряженное окисление метана и формиата в присутствии гидроксиламина клетками *Methylomonas alba* BG8 или *Methylosinus trichosporium* OV3b, содержащими мембранную ММО, сопровождается транслокацией протонов [46]. Это свидетельствует о генерации протондвижущей силы на этапе транспорта электронов от формиата через НАДН к ММО, поскольку другие электронтранс-

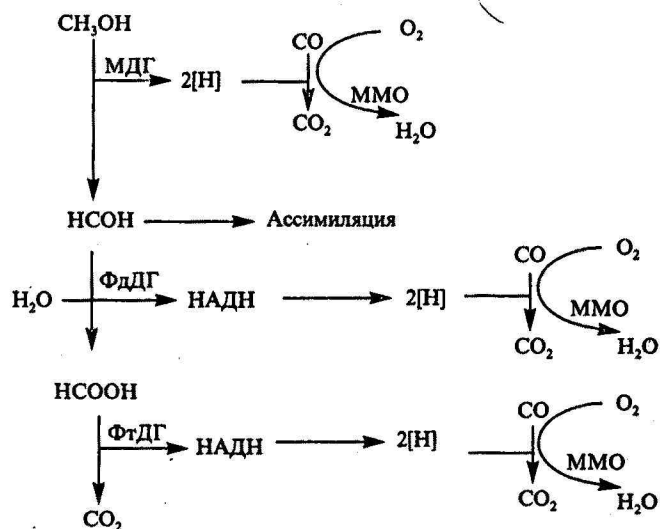


Рис. 1. Схема сопряжения реакции монооксигенирования окиси углерода и дегидрирования метанола при синтаболизме этих субстратов у метанотрофов. ММО — метанмонооксигеназа, МДГ — метанолдегидрогеназа, ФдДГ — формальдегиддегидрогеназа, ФтДГ — форматдегидрогеназа.

портные цепи ингибированы гидроксиламином. Окисление метанола клетками метанотрофов сопровождается также генерацией протонного градиента ($\Delta p\text{H}$) [46]. Анализ ингибирования этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) окисления метанола и пропанола в клетках метанотрофов, а также влияния трипсина на окисление метанола клетками, обработанными трис-ионами и ЭДТА, позволил предположить, что МДГ в клетках метанотрофов локализована в периплазме [19]. В силу этого протондвижущие свойства системы окисления метанола в клетках метанотрофов, так же, как и других грамотрицательных метилотрофов, объясняются функционированием протонтранслоцирующей “редокс-ветви” (redox arm). Протонный градиент создается за счет того, что освобождающиеся при дегидрировании метанола протоны остаются в периплазме, а электроны транспортируются через мембрану цитохромными компонентами к терминальной оксидазе и акцептируются кислородом с потреблением протонов цитоплазмы.

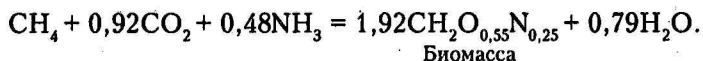
Изучен механизм кометаболизма неростовых субстратов (этана, окиси углерода) у метанотрофов [11, 12, 19]. Установлено, что высокая эффективность использования углерода и энергии метанола метанотрофами может быть достигнута только в том случае, если большая часть его электронов будет акцептирована при функционировании ММО. Это было показано при культивировании метанотрофов на метаноле в присутствии неассимилируемых субстратных аналогов метана — CO или этана [11, 19, 47]. Совместная ассимиляция метанотрофами метанола и субстратного аналога метана (этана или CO) была названа нами синтаболизмом неростовых субстратов [19, 58]. Этот процесс реализуется благодаря сопряжению реакций дегидрирования метанола с монооксигенированием второго субстрата (рис. 1), что обеспечивает более эффективное использование энергии и углерода метанола и свидетельствует о вкладе монооксигеназной реакции в энергетический метаболизм. Этими опытами была показана возможность использования для биосинтеза белка и других метаболитов так называемых неростовых субстратов.

Процесс биосинтеза становится возможным при совместном введении в питательную среду не менее двух неростовых субстратов.

При ассимиляции метанола метанотрофами функционируют два механизма: монооксигенирование метанола неспецифичной ММО и дегидрирование метанола МДГ. Блокирование ММО ацетиленом может вызвать остановку роста клеток из-за отсутствия альтернативных монооксигеназному механизму энергосопряженных систем переноса электронов на кислород (*Methylosinus trichosporium* ОВЗб) либо стимуляцию роста в результате экспрессии таких систем (*Methylomonas rubra* 15 ш и *Methylococcus capsulatus* 9 м) [48].

Результаты исследования роли ММО в энергетическом метаболизме метанотрофов можно суммировать следующим образом. Особенностью энергетического метаболизма метанотрофов является участие ММО в акцептировании большей части электронов ассимилируемого субстрата. При функционировании мембранной ММО этот процесс сопряжен с генерацией энергии в форме трансмембранного электрохимического градиента. Еще один механизм создания электрохимического градиента реализуется при дегидрировании метанола периплазматически расположенной МДГ. Это существенно отличает процессы генерации энергии у метанотрофов от таковых у гетеротрофных микроорганизмов. Отсутствие способности всех изучавшихся нами метанотрофов использовать в качестве единственных источников углерода и энергии многоуглеродные субстраты обусловлено тем, что их метаболизм не сопряжен с функционированием ММО и МДГ, а системы переноса электронов от НАДН на кислород не обеспечивают энергетические потребности клеток.

Биосинтез практически ценных продуктов на метане. Проведена теоретическая оценка эффективности синтеза биомассы микроорганизмами при использовании источников углеродного питания различной степени восстановленности. Как известно, рост микроорганизмов может осуществляться на субстратах как с максимальной восстановленностью углерода (метан, другие углеводороды), так и с минимальной (оксалат). Существенным моментом для метаболизма этих соединений является то, что элементный состав этих субстратов существенно отличается от элементного состава биомассы. Соотношение углерода, водорода, кислорода определяет восстановленность углерода субстрата (γ_s) или биомассы (γ_b). Восстановленность углерода максимальна у метана ($\gamma_s = 8$), минимальна у оксалата ($\gamma_s = 1$), среднее значение (γ_b) для биомассы микроорганизмов составляет 4,15. Для приведения в соответствие восстановленности углерода биомассы без потери энергии (в случае CH_4) необходимо вовлечение более окисленного соединения углерода, например CO_2 :



В случае оксалата восстановленность его углерода должна быть увеличена до уровня восстановленности углерода биомассы за счет потери части углерода в виде CO_2 :



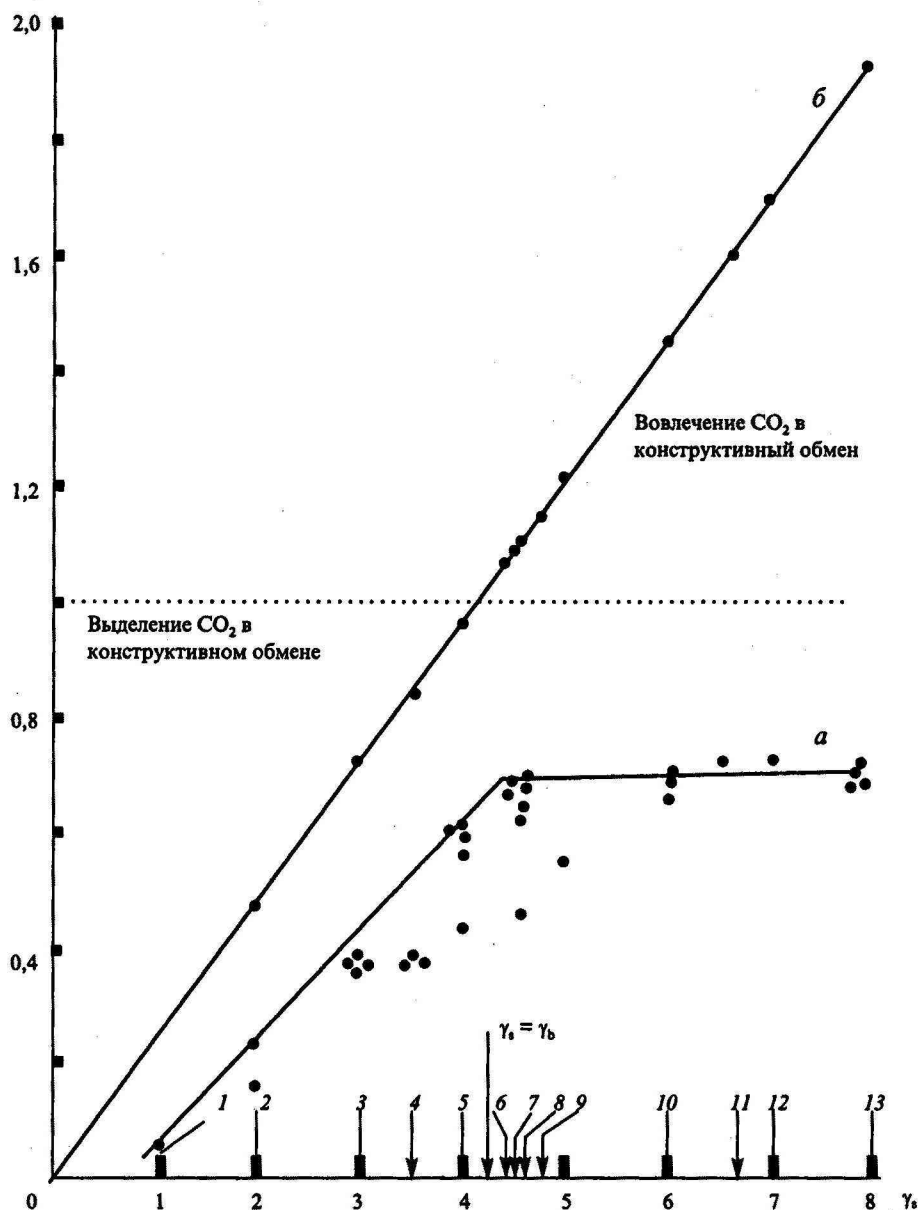


Рис. 2. Экспериментальная (а) и теоретическая (б) зависимости выхода биомассы (Y_c) от восстановленности углерода ростового субстрата (γ_s): 1 — оксалат; 2 — формиат; 3 — фумарат, малат, цитрат; 4 — сукцинат; 5 — глюкоза, ацетат; 6 — глицерин; 7 — маннит, сорбит; 8 — бензоат; 9 — фенилацетат; 10 — метанол, этанол; 11 — пропан; 12 — этан; 13 — метан.

Метаболизм субстратов с высокой степенью восстановленности углерода обычно протекает с участием оксидазных или оксигеназных реакций. При этом значительная часть электронов субстрата переносится на кислород и окончательно выбывает из метаболизма. Именно вовлечение кислорода на начальных этапах метаболизма сильно восстановленных субстратов (углеводородов, спиртов) обуславливает то, что получаемый экспериментально выход биомассы (Y_c) намного ниже теоретически возможного (рис. 2). Установленная закономерность свидетельствует о том, что для повышения эффективнос-

ти синтеза биомассы на основе субстратов с $\gamma_s > \gamma_b$ необходимо вовлечение в метаболизм углекислоты в качестве акцептора избыточных электронов.

Разработаны теоретические основы биотехнологии получения микробного белка и других ценных продуктов при использовании природного газа в качестве основного сырья [53, 55, 61, 62]. Селекционированы активные продуценты микробного белка (гаприна) на основе природного газа (метана) [12, 15]. Исследованы факторы, дестабилизирующие процесс биосинтеза белка на природном газе. Изучена взаимозависимость монокультур в микробных ассоциациях (метаноокисляющие + этанолиспользующие бактерии), растущих на природном газе [15, 63]. Установлено, что их симбиоз не является облигатным. Регулирующим фактором симбиоза метаноокисляющих и этанолиспользующих бактерий является уровень органических веществ (экзометаболитов метанотрофов) в культуральной жидкости. Их уровень формирует и координирует количественное соотношение монокультур, определяет стабильность симбиоза и биосинтетических процессов.

С целью формирования фонда промышленных штаммов — продуцентов гаприна проведены испытания *Methylococcus thermophilus* ИМВ-111п/6 на опытно-промышленной установке Светлоярского завода БВК производственного объединения “Волгоградбиосинтез”. В процессе проведения испытаний исследовано влияние температуры, pH, pO_2 , концентрации источника азота на скорость роста штамма ИМВ-111п/6. Нарботаны крупнотоннажные партии гаприна. Выявлена высокая чувствительность клеточной популяции к ароматическим углеводородам, концентрация которых широко варьирует в природном газе ряда месторождений. Предложена схема очистки природного газа. Согласно Акту испытаний от 20.09.88 г. штамм *M. thermophilus* ИМВ-111п/6 может быть использован как альтернативный продуцент гаприна.

Для разработки подходов к получению штаммов метанотрофов — сверхсинтетиков аминокислот изучена регуляция синтеза ароматических аминокислот у *M. rubra* и *M. thermophilus* [18]. Впервые в бесклеточных экстрактах двух штаммов метанотрофов определена активность первого фермента разветвленного пути биосинтеза ароматических аминокислот — 3-дезоксид-арабино-гептулозонат-7-фосфатсинтазы (ДАГФ-синтазы). Показано, что ароматические аминокислоты являются эффекторами ДАГФ-синтазы, а ретроингибирование данного фермента является одним из способов регуляции синтеза ароматических аминокислот у исследуемых метанотрофов. Менее чувствительный к ароматическим аминокислотам вариант *M. thermophilus* селекционирован в процессе непрерывного культивирования. Активность ДАГФ-синтазы в его клетках не была подвержена ретроингибированию. Он был использован для получения УФ-индуцированных мутантов, устойчивых к ароматическим аминокислотам и их аналогам. Аналогорезистентные мутанты *M. thermophilus* были устойчивы к фенилаланину и тирозину. Повторный мутагенез, селекция мутантов, устойчивых к более высоким концентрациям аналогов аминокислот, и скрининг данных мутантов по способности продуцировать ароматические аминокислоты позволили отобрать ряд регуляторных мутантов, образующих фенилаланин. Способность к сверхсинтезу фенилаланина сохраняется у полученных штаммов при их пересеве в течение трех лет.

Экологические последствия радиоактивного загрязнения для почвенных бактерий в зоне ЧАЭС

Катастрофа на Чернобыльской атомной электростанции (ЧАЭС) в 1986 г. создала естественную модель для изучения последствий длительного воздействия радиации на биоту. Накоплен значительный материал о действии ионизирующего излучения на фауну и флору на всех уровнях их организации. Наименее изучены последствия катастрофы на ЧАЭС для бактерий. В связи с этим исследовано разнообразие почвенных бактерий в зоне ЧАЭС. Микробиологический анализ почв проводили трижды в год (весной, летом и осенью). Показано, что в поверхностном горизонте почв в зоне ЧАЭС (радиоактивность — 0,3—17,0 мкКи на 1 кг почвы на глубине 0—2 см) общее количество клеток хемоорганотрофных бактерий, так же как и количество выявленных видов бактерий, значительно меньше, чем в контрольных почвах (радиоактивность — 0,002—0,006 мкКи на 1 кг почвы) [42]. Численность целлюлозоразрушающих, нитрифицирующих и сульфатовосстанавливающих бактерий в почвах в зоне ЧАЭС на 1—2 порядка ниже, чем в контрольных почвах [44]. Таким образом, под влиянием антропогенной радиации произошло уменьшение численности и разнообразия почвенных бактерий. Установлено нетипичное распределение бактерий по профилю почв. Индексы видового разнообразия бактерий в этих почвах имеют очень низкое значение. Полученные результаты дают основание считать, что микробный состав почв в зоне ЧАЭС стал значительно беднее после аварии на ЧАЭС в 1986 г. и не восстановился к 1995 г. [42].

Во всех образцах почв в зоне ЧАЭС обнаружены *Bacillus cereus* (или *B. subtilis*), а также *Methylobacterium extorquens* (или *M. mesophilicum*). Представители этих видов проявляли высокую устойчивость к перекиси водорода (0,3—1,0 М), действие которой в известной степени имитирует действие ионизирующего излучения. Другие виды хемоорганотрофных бактерий обнаружены не во всех исследованных образцах почв зоны ЧАЭС, их представители характеризовались низкой устойчивостью к H_2O_2 . Очевидно, преимущество для выживания в зоне катастрофы на ЧАЭС получили бактерии, которые имеют эффективные системы нейтрализации перекисных соединений (наряду с механизмами репарации повреждений ДНК) [44].

Установлено, что штаммы *Methylobacterium*, изолированные из различных экосистем (почва, растительность) зоны ЧАЭС, характеризуются высокой скоростью возникновения формальдегидустойчивых мутантов. Показано с помощью флуктуационного теста, что формальдегид не является мутагеном для штаммов *Methylobacterium* [43]. Высокая скорость мутирования штаммов *Methylobacterium* позволяет предположить также потенциально высокую изменчивость этих бактерий, а следовательно, и возможность приспособиться к экстремальным условиям обитания.

Показано, что изолированные штаммы *Methylobacterium* и *Bacillus* устойчивы к УФ-излучению. Сублетальная доза для исследованных штаммов *Methylobacterium* составляет около 200 Дж/м², для штаммов *Bacillus* — 100—200 Дж/м². Кривые зависимости выживаемости штаммов *Methylobacterium* от дозы УФ-облучения имеют “плечо” на начальных отрезках кривой, что свидетельствует о достаточно эффективной защите ДНК у штаммов *Methylobacterium* от действия УФ-лучей [43]. Дозы ионизирующего излучения менее

0,6 кГр не оказывают влияния на жизнеспособность исследованных штаммов *Methylobacterium*. Сублетальная доза составляет 5–10 кГр для некоторых из них, т. е. они более устойчивы к ионизирующему излучению, чем другие эубактерии (исключение — представители семейства *Deinococcaceae*) [43]. Полученные результаты свидетельствуют о наличии у штаммов *Methylobacterium* активных систем репарации повреждений ДНК, что, по-видимому, позволило им выжить в радиационно загрязненных экосистемах Чернобыльской АЭС.

Технология микробной конверсии отходов животноводческих комплексов и птицефабрик в практически ценные продукты

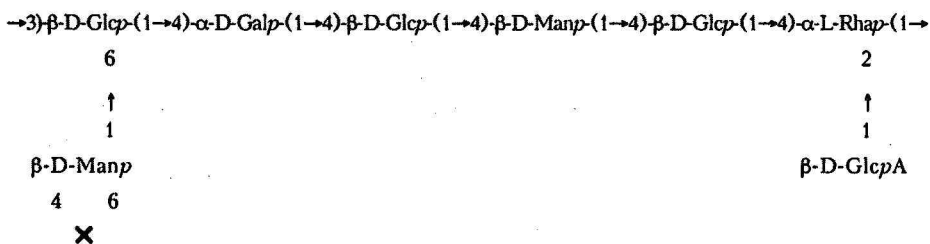
В промышленно развитых странах 15–24 % энергоносителей получают в виде биогаза, в то время как в Украине при существовании громадного дефицита энергии строительство установок для получения биогаза путем микробного синтеза не осуществляется. Разработаны научные основы микробной конверсии отходов животноводческих комплексов и птицефабрик в биогаз (метан). На Сумском машиностроительном заводе им. Фрунзе создана биогазовая установка БИОГАЗ-300 объемом 300 м³ для переработки отходов свиного комплекса. Разработана гибкая, безотходная, энерго-, ресурс- и водосберегающая биотехнология, защищающая экологию территорий, прилегающих к животноводческим комплексам. Она позволяет из опасных токсических отходов производить практически полезные экологически чистые продукты: биогаз, кормовые белково-витаминные добавки для питания животных, птиц, рыбы; удобрения, лишенные семян сорняков и содержащие живые культуры ризосферных микроорганизмов, специфичные для каждого определенного вида растений. Созданная технология позволяет также очищать сточные воды до кондиций, необходимых для безопасного сбрасывания их в открытые водоемы [22, 61].

Показано, что анаэробное брожение и образование биогаза осуществляется многовидовым консорциумом, состоящим из первичных факультативных и облигатных анаэробов и метанообразующих бактерий (вторичные анаэробы). Скорость и глубина гидролитического этапа синтеза биогаза определяются интенсивностью конверсии органического сырья, осуществляемого первичными анаэробами. Установлено, что для интенсификации процесса получения биогаза следует использовать искусственно созданные микробные ассоциации, состоящие из первичных и вторичных анаэробов.

Выделен широкий спектр анаэробных штаммов, трансформирующих сельскохозяйственные отходы в практически ценные вещества [22]. Разработаны методы длительного хранения анаэробных бактерий, селекции и создания искусственных микробных ассоциаций, в состав которых входят деструкторы органических веществ и метаногены. Созданы методы получения и хранения микробных заквасок, вводимых в состав метаногенных консорциумов. Интенсификация процесса получения биогаза достигается путем увеличения биомассы микроорганизмов за счет частичного возвращения сброженного сырья в метантенк или иммобилизации бактерий на определенных носителях [61]. Теоретические расчеты показывают, что при анаэробной переработке 500 т сырья (средние суточные отходы животноводческого комплекса или птицефабрики) количество полученного биогаза может достигать 4500 м³. Годовая дополнительная добыча углеводородного топлива за счет производства биогаза может составлять 800–950 тыс. тонн условного топлива.

Регуляция синтеза экзополисахарида этаполана. Селекционирован штамм бактерий *Acinetobacter* sp. — продуцент высоковязкого экзополисахарида (ЭПС) на основе этанола. Синтезируемый *Acinetobacter* sp. ЭПС назван этаполаном. Исследованы культуральные и физиолого-биохимические свойства штамма-продуцента, определены параметры его роста и синтеза ЭПС. Разработана принципиально новая биотехнология получения этаполана на основе этанола, позволяющая в 4–5 раз повысить продуктивность процесса его биосинтеза за счет внесения в среду C_4 -дикарбоновых кислот — интермедиатов метаболизма этанола, вовлекаемых в глюконеогенез [2].

Регуляция состава и физико-химических свойств этаполана. Этаполан состоит из нейтрального и двух кислых ЭПС, один из которых является ацилированным [3, 25]. Нейтральный ЭПС является минорным компонентом — его содержание составляет около 5 %. Разработан метод разделения этаполана на ацилированный и неацилированный компоненты, основанный на том, что растворы ацилированных ЭПС обладают эмульгирующими свойствами [25]. Кислые ацилированный и неацилированный ЭПС идентичны по молярному соотношению D-глюкозы, D-маннозы, D-галактозы, L-рамнозы, D-глюкуроновой и пировиноградной кислот (3:2:1:1:1:1). Различие между этими ЭПС состоит в том, что ацилированный полисахарид содержит О-ацильные группы (C_{10} — C_{18}). На основе химических модификаций ЭПС, сольволиза ЭПС безводным фтористым водородом, деградации по Смиту, 1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии установлена одинаковая структура повторяющейся единицы углеводной цепи неацилированного полисахарида и ацилированного ЭПС после отщепления жирных кислот:



(S) CH_3 $COOH$

Предполагается, что в ацилированном ЭПС один из остатков глюкозы и остаток галактозы О-ацилированы.

Растворы этаполана обладают следующими физико-химическими свойствами: способностью к эмульгированию, повышению вязкости в присутствии одно- и двухвалентных катионов, при понижении pH, в области низких скоростей сдвига [1, 2, 51].

Свойства растворов этаполана определяются соотношением в его составе ацилированного и неацилированного компонентов, а также содержанием жирных кислот в ацилированном полисахариде [26]. Растворы ЭПС с высоким содержанием неацилированного полисахарида (более 50 %) не структурируются катионами, не повышают вязкость в области низких значений pH, а также в системе медь — глицин.

В процессе периодического культивирования *Acinetobacter* sp. в составе синтезируемых ЭПС изменяется соотношение ацилированного и неацили-

рованного компонента, а также содержание жирных кислот в ацилированном полисахариде, что сопровождается изменением свойств их растворов [3, 24, 28, 67]. Образование ацилированного ЭПС и степень его ацилирования зависят от концентрации одновалентных катионов в среде культивирования [27].

Разработана технология получения этаполана со стабильными заданными свойствами, позволяющая одновременно увеличить в 4–5 раз количество синтезированных ЭПС и регулировать содержание жирных кислот в их составе. Это достигается за счет внесения в среду культивирования бактерий C_4 -дикарбоновых кислот (интермедиатов метаболизма этанола) в сочетании с изменением концентрации одновалентных катионов в ростовой среде [28].

Физиологические функции этаполана. Показано, что этаполан защищает клетки продуцента от неблагоприятных факторов внешней среды (действия биоцидов, детергентов, тяжелых токсичных металлов, высушивания и др.) [29, 30]. Наиболее полная реализация защитных функций этаполана наблюдается в неоптимальных условиях культивирования продуцента. Установлена корреляция между физико-химическими свойствами ЭПС *Acinetobacter* sp., синтезируемых в различных условиях культивирования, и их защитными функциями.

В неоптимальных условиях культивирования бактерий преимущественно синтезируются ЭПС, растворы которых характеризуются более высокой вязкостью в присутствии катионов, в области низких значений pH, а также в системе медь — глицин, т.е. превосходящие по своим физико-химическим свойствам ЭПС, получаемые в оптимальных условиях. Это обусловлено необходимостью более эффективного выполнения такими ЭПС защитных функций в неблагоприятных условиях [31].

Полученные результаты стали основой для разработки новых подходов к получению ЭПС с заданными физико-химическими свойствами. Установлено, что культивирование бактерий в двухстадийном процессе (в оптимальных для роста продуцента и синтеза ЭПС условиях на первой стадии с переходом в неоптимальные на второй) позволяет без снижения количества синтезируемых ЭПС улучшить физико-химические свойства растворов ЭПС, определяющие их практическую значимость.

Этаполан — экзополисахарид многофункционального назначения. Этаполан является полисахаридом многофункционального назначения и может быть использован для интенсификации нефтедобычи, в горнодобывающей, пищевой, химической промышленности, косметологии и др. На основе гелеобразующих композиций этаполана разработан способ изоляции притока пластовых вод, позволяющий увеличить нефтедобычу и снизить обводненность добываемой нефти [51]. Разработанный способ изоляции притока пластовых вод на основе этаполана был использован в 1991–1992 гг. для гидроизоляции выработанных скважин Прилукского месторождения (Черниговская обл.). Использование 1 т этаполана дает возможность получить дополнительно до 240 т нефти. На основе этаполана разработаны технологии изготовления шампуней “Ирида” и “Леста”, косметических кремов под общим названием “Экол”, технического моющего средства “БИМС-1”. Благодаря способности этаполана адсорбировать и выводить из организма соли тяжелых металлов хлебобулочные продукты с его использованием (хлеб “Житомирский” и “Полесский”) могут быть рекомендованы для профилактического питания.

Разработаны технические условия на выпуск этаполана (ТУ: 550 МЭ.16296333.01-93 от 08.07.93 г.). Технология получения этаполана со стабильными заданными свойствами прошла стадию опытно-промышленных и промышленных испытаний на Трипольском биохимическом заводе (г. Обухов Киевской обл.).

Некоторые исследования, проводимые в отделе, выполнялись по заказу Министерства науки Украины и Госкомитета Украины по науке и технологиям. Работа с коллекцией метилотрофов-экстремофилов поддержана грантом INTAS-93-3512 "Maintenance, study and development of endangered culture Collections of extremophilic microorganisms in Armenia, Ukraine and Belarus". Тема по изучению влияния антропогенной радиации на микрофлору в зоне ЧАЭС поддержана грантом INTAS-94-2825 "Investigation of the effect of prolonged nuclear radiation on the aboriginal bacterial populations in zone of the Chernobyl Atomic Power Station catastrophe". Работы сотрудников были представлены на 48 Международных конгрессах и симпозиумах.

*Ю. Р. Малашенко, В. О. Романовська, І. Г. Соколов, Т. О. Грінберг,
Т. П. Пирог, Ф. В. Мучник*

Ін-т мікробіології і вірусології НАН України, Київ

БИОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ, ШО АСИМІЛЮЮТЬ C_1 — C_2 -СПОЛУКИ, І БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ЇХ ВИКОРИСТАННЯ

Резюме

Наведено основні напрямки фундаментальних досліджень відділу біології газоокислюючих мікроорганізмів — екологія, селекція, таксономія, біохімія, генетика бактерій, що асимілюють C_1 — C_2 -сполуки, математичне моделювання мікробіологічних процесів, а також прикладних — розробка наукових основ біотехнологій синтезу практично важливих продуктів (білка, екзополісахаридів, кормових добавок, біогазу) на основі нехарчових субстратів, пошук покладів вуглеводневої сировини, захист довкілля.

Ключові слова: метанотрофи, метилотрофи, метаногени, екологія, таксономія, метаболізм, генетика, біогаз, етаполан, математичні моделі, біотехнологія

*Yu. R. Malashenko, V. A. Romanovskaya, I. G. Sokolov,
T. A. Grinberg, T. P. Pirog, F. V. Muchnik*

Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

BIOLOGY OF BACTERIA ASSIMILATING C_1 — C_2 -COMPOUNDS AND BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS OF THEIR APPLICATIONS

Summary

Main directions of the research work of the Department of Biology of Gas Oxidizing Microorganisms are described in the paper. Fundamental studies concern ecology, selection, taxonomy, physiology, biochemistry, genetics of bacteria utilizing C_1 — C_2 -compounds, mathematical simulation of microbiological processes. Applied studies are devoted to development of scientific basis of biotechnologies for synthesis of important products (single cell protein, exopolysaccharides, food ingredients, biogas) from non-food substrates, search for the hydrocarbon deposits and protection of the environment.

Key words: methanotrophs, methylotrophs, methanogens, ecology, metabolism, genetics, biogas, ethapolan, mathematical models, biotechnology

The author's address: Yu. R. Malashenko, Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Zabolotny St., Kyiv, 252143, Ukraine

1. Гринберг Т. А., Пирог Т. П., Полищук А. М., Краснопецева Н. В. Биополимеры, используемые для увеличения нефтеотдачи пластов // Микробиол. журн. — 1990. — 52, № 2. — С. 100—112.
2. Гринберг Т. А., Пирог Т. П., Малащенко Ю. Р., Пинчук Г. Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C—C₂-соединениях. — Киев: Наук. думка, 1992. — 212 с.
3. Гринберг Т. А., Пирог Т. П., Малащенко Ю. Р. и др. Изменение состава и свойств экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. в процессе периодического культивирования // Микробиология. — 1994. — 63, № 6. — С. 1015—1019.
4. Малащенко Ю. Р., Квасников Е. И., Романовская В. А., Богаченко В. Н. Выделение чистых культур облигатных метаноокисляющих бактерий // Микробиология. — 1971. — 40, № 4. — С. 724—729.
5. Малащенко Ю. Р., Романовская В. А., Богаченко В. Н. Особенности углеродного питания микроорганизмов, растущих на природном газе // Микробиология. — 1973. — 42, № 3. — С. 403—408.
6. Малащенко Ю. Р., Романовская В. А., Богаченко В. Н., Криштаб Т. П. Влияние органических веществ на ассимиляцию метана облигатными метилотрофами // Микробиология. — 1974. — 43, № 2. — С. 343—348.
7. Малащенко Ю. Р., Лялько В. И., Романовская В. А. Участие микроорганизмов, окисляющих газообразные углеводороды, в круговороте углеводорода биосферы // Изв. АН СССР. Сер. биол. — 1975. — № 5. — С. 682—693.
8. Малащенко Ю. Р., Романовская В. А., Богаченко В. Н. Метод выделения чистых культур мезофильных, термотолерантных и термофильных метаниспользующих бактерий // Микробиология. — 1975. — 44, № 4. — С. 707—713.
9. Малащенко Ю. Р., Романовская В. А., Богаченко В. Н., Швед А. Д. Термофильные и термотолерантные бактерии, ассимилирующие метан // Микробиология. — 1975. — 44, № 5. — С. 855—862.
10. Малащенко Ю. Р., Романовская В. А., Богаченко В. Н. и др. Особенности ассимиляции углеводородных компонентов природного газа монокультурами бактерий и их искусственными ассоциациями // Изв. АН СССР. Сер. биол. — 1975. — № 1. — С. 44—51.
11. Малащенко Ю. Р., Романовская В. А., Соколов И. Г., Криштаб Т. П. О механизме соокисления этана интактными клетками облигатных метилотрофов // Микробиология. — 1976. — 45, № 6. — С. 1105—1107.
12. Малащенко Ю. Р., Романовская В. А. Теоретические и прикладные аспекты изучения метаниспользующих бактерий // Микробиол. журн. — 1978. — 40, № 3. — С. 275—291.
13. Малащенко Ю. Р., Романовская В. А., Троценко Ю. А. Метаноокисляющие микроорганизмы. — Киев: Наук. думка, 1978. — 198 с.
14. Малащенко Ю. Р., Соколов И. Г., Романовская В. А. Некоторые физиолого-биохимические свойства новых форм облигатных метилотрофов // Успехи микробиологии. — 1978. — № 3. — С. 133—141.
15. Малащенко Ю. Р., Мучник Ф. В., Романовская В. А., Садовников Ю. С. Математические модели и ЭВМ в микробиологической практике. — Киев: Наук. думка, 1980. — 250 с.
16. Малащенко Ю. Р., Хайер Ю., Будкова Е. Н. и др. Метаноокисляющая микрофлора в пресных и соленых водоемах // Микробиология. — 1987. — 56, № 1. — С. 134—139.
17. Малащенко Ю. Р., Соколов И. Г., Криштаб Т. П. Источники восстановительных эквивалентов для монооксигенирования углеводородов в клетках метаноокисляющих бактерий // Микробиология. — 1987. — 56, № 3. — С. 374—380.
18. Малащенко Ю. Р., Пинчук Г. Э., Соколов И. Г. Регуляция активности аспартаткиназы *Methylococcus thermophilus* аминокислотами аспартатного семейства // Микробиология. — 1987. — 56, № 5. — С. 740—745.
19. Малащенко Ю. Р., Соколов И. Г., Романовская В. А. Микробный метаболизм неростовых субстратов. — Киев: Наук. думка, 1987. — 195 с.
20. Малащенко Ю. Р., Мучник Ф. В. Математическая модель процесса диффузии и потребления бактериями газообразного субстрата в водной экониче при стационарных условиях // Микробиол. журн. — 1987. — 49, № 1. — С. 28—30.
21. Малащенко Ю. Р., Мучник Ф. В. Математическая модель диффузии и потребления бактериями газообразного субстрата в поверхностном слое водоема при нестационарных условиях // Микробиол. журн. — 1988. — 50, № 5. — С. 12—13.
22. Малащенко Ю. Р., Хайер Ю., Романовская В. А. и др. Биология метанобразующих и метаноокисляющих бактерий. — Киев: Наук. думка, 1993. — 255 с.
23. Пинчук Г. Э., Щурова З. П., Шатохина Э. С. и др. Характеристика роста метаноокисляющей бактерии *Methylococcus thermophilus* в присутствии аминокислот аспартатного семейства // Микробиология. — 1987. — 56, № 4. — С. 621—625.
24. Пирог Т. П., Краснопецева Н. В., Гринберг Т. А. и др. Изменение некоторых свойств экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. в процессе периодического культивирования // Биотехнология. — 1991. — № 4. — С. 67—70.

25. Пирог Т. П., Гринберг Т. А., Пинчук Г. Э. и др. Разделение экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp., на ацилированный и неацилированный компоненты // Микробиология. — 1994. — 63, № 5. — С. 840—846.
26. Пирог Т. П., Гринберг Т. А., Сенченко С. Н., Малащенко Ю. Р. Химический состав экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. на средах с различным содержанием K^+ // Микробиология. — 1995. — 65, № 4. — С. 527—532.
27. Пирог Т. П. Влияние одновалентных катионов на образование ацилированных экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. // Микробиология. — 1996. — 65, № 5. — С. 639—643.
28. Пирог Т. П. Образование ацилированных экзополисахаридов в процессе периодического культивирования *Acinetobacter* sp. // Микробиология. — 1996. — 65, № 5. — С. 644—648.
29. Пирог Т. П., Гринберг Т. А., Малащенко Ю. Р. Защитные функции экзополисахаридов, синтезируемых бактериями *Acinetobacter* sp. // Микробиология. — 1997. — 66, № 3. — С. 335—340.
30. Пирог Т. П. Роль экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. в защите клеток продуцента от действия тяжелых токсичных металлов // Микробиология. — 1997. — 66, № 3. — С. 341—346.
31. Пирог Т. П., Гринберг Т. А., Малащенко Ю. Р. Влияние факторов внешней среды на образование и свойства экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. // Прикл. биохимия и микробиология. — 1998. — 34, № 1. — С. 70—74.
32. Романовская В. А., Малащенко Ю. Р., Богаченко В. Н. Уточненные диагнозы родов и видов метаниспользующих бактерий // Микробиология. — 1978. — 47, № 1. — С. 120—130.
33. Романовская В. А., Садовников Ю. С., Малащенко Ю. Р., Формирование таксонов метаниспользующих бактерий методами нумерического анализа // Микробиология. — 1978. — 47, № 5. — С. 823—830.
34. Романовская В. А. Вопросы номенклатуры облигатных метилотрофов // Микробиология. — 1978. — 47, № 6. — С. 163—172.
35. Романовская В. А., Малащенко Ю. Р., Богаченко В. Н. О таксономическом положении метанокисляющих бактерий // Журн. общей биологии. — 1978. — 39, № 6. — С. 895—904.
36. Романовская В. А., Людвиченко Е. С., Криштаб Т. П. и др. Роль экзогенной связанной углекислоты в метаболизме метанокисляющих бактерий // Микробиология. — 1980. — 49, № 5. — С. 687—694.
37. Романовская В. А., Малащенко Ю. Р., Грищенко Н. И. Диагностика метанокисляющих бактерий нумерическими методами на основе жирнокислотного состава клеток // Микробиология. — 1980. — 49, № 6. — С. 969—975.
38. Романовская В. А., Соколов И. Г., Малащенко Ю. Р. Сопряжение органотрофного и литотрофного метаболизма у метаниспользующих бактерий // Микробиология. — 1985. — 54, № 1. — С. 11—16.
39. Романовская В. А. Современные направления в систематике бактерий // Микробиол. журн. — 1989. — 51, № 1. — С. 82—94.
40. Романовская В. А., Будкова Е. Н., Столяр С. М., Малащенко Ю. Р. Спонтанная изменчивость метанокисляющих бактерий // Микробиол. журн. — 1991. — 53, № 1. — С. 38—44.
41. Романовская В. А., Столяр С. М., Малащенко Ю. Р. Систематика метилотрофных бактерий. — Киев: Наук. думка, 1991. — 295 с.
42. Романовская В. А., Столяр С. М., Малащенко Ю. Р., Шатохина Э. С. Влияние радиации длительного действия на разнообразие гетеротрофных бактерий в почвах ЧАЭС // Микробиол. журн. — 1996. — 58, № 5. — С. 3—12.
43. Романовская В. А., Соколов И. Г., Малащенко Ю. Р., Рокитко П. В. Мутабельность эпифитных и почвенных бактерий рода *Methylobacterium* и их устойчивость к УФ- и ионизирующему излучению // Микробиология. — 1998. — 67, № 1. — С. 106—115.
44. Романовская В. А., Соколов И. Г., Рокитко П. В., Черная Н. А. Экологические последствия радиоактивного загрязнения для почвенных бактерий в 10 км зоне ЧАЭС // Микробиология. — 1998. — 67, № 2. — С. 274—280.
45. Соколов И. Г., Романовская В. А., Шкурко Ю. И., Малащенко Ю. Р. Сравнительная характеристика ферментных систем *Methylococcus thermophilus* // Микробиология. — 1980. — 49, № 2. — С. 202—209.
46. Соколов И. Г. Сопряжение процесса транспорта электронов к метанмонооксигеназе с транслокацией протонов у метанокисляющих бактерий // Микробиология. — 1986. — 55, № 5. — С. 715—722.
47. Соколов И. Г. Реакция монооксигенирования как сток электронов метанола у метанокисляющих бактерий // Микробиология. — 1988. — 57, № 5. — С. 716—723.
48. Соколов И. Г., Столяр С. М., Криштаб Т. П., Пинчук Г. Э. Роль метанмонооксигеназы при ассимиляции метанола метанокисляющими бактериями // Микробиол. журн. — 1989. — 51, № 2. — С. 38—46.

49. Соколов И. Г., Романовская В. А. Механизмы облигатной метилотрофии // Микробиол. журн. — 1992. — 54, № 5. — С. 87—104.
50. Столяр С. М., Романовская В. А., Малащенко Ю. Р. Поиск систем генетического обмена для метанооксидающих бактерий // Микробиология. — 1995. — 64, № 5. — С. 686—691.
51. Grinberg T. A., Pirog T. P., Malashenko Yu. R., Vlasov S. A. Ethapolan: A new microbial exopolysaccharide for oil industry // Energy and Fuels. — 1995. — N 9. — P. 1086—1089.
52. Heyer J., Malashenko Yu., Berger U., Budkova E. Verbreitung methanotropher Bakterien // Z. Allg. Microbiol. — 1984. — 24, N 10. — S. 725—744.
53. Malashenko Yu., Klimenko A., Kvasnikov E. et al. Protein recovery from gasoxidizing bacteria // Int. Gas Union. XIth Int. Gas Conf. — Moscow, 1970. — P. 3—18.
54. Malashenko Yu., Romanovskaya V. Ecology and isolation of bacteria growing on natural hydrocarbon gases // Bull. Ecol. Res. Comm. (Stockholm). — 1973. — 17. — P. 159—186.
55. Malashenko Yu., Romanovskaya V., Muchnik F., Duldin A. A mathematical model of the growth rate of a artificial microbial association on natural gas // Proc. 1st Intersect. Congr. of IAMS. / Ed. T. Hasegawa, Science Council of Japan. — 1975. — 5. — P. 127—131.
56. Malashenko Y. R. Isolation and characterization of new species (thermophilic and thermotolerant ones) of methane utilizer // Microbial production and utilization of gases (H_2 , CO , CH_4) / Eds H. G. Sclegel, G. Gottschalk, N. Pfennig. — Gottingen, 1976. — P. 293—300.
57. Malashenko Y. R., Muchnik F. V. Mathematical model of diffusion and microbial consumption of atmospheric gases in water reservoir // Abstr. 5th Int. Symp. Microbial Ecology (Kyoto, Japan, 5—9 June, 1989). — Kyoto, 1989. — P. 44.
58. Romanovskaya V., Malashenko Yu., Sokolov I., Kryshchak T. The competitive inhibition of the microbial methane oxidation by ethane // Microbial production and utilization of gases / Eds H. G. Sclegel, G. Gottschalk, N. Pfennig. — Gottingen: Akademie der Wissenschaften zu Gottingen, 1976. — P. 345—351.
59. Romanovskaya V., Malashenko Yu., Lyalko V. et al. Involvement of methane-utilizing microorganisms in accumulation and recirculation of readily mobile carbon and nitrogenous compounds // Ecol. Bull. (Stockholm). — 1977. — 25. — P. 556—560.
60. Romanovskaya V., Malashenko Yu., Voloshina E., Boudkova E. Characteristics of carbon and nitrogen metabolism of methane-oxidizing bacteria // Proc. 7th Int. Symp. on Continuous Cultivation of Microorganisms. — Prague, 1980. — P. 521—526.
61. Romanovskaya V., Karpenko V., Pankshava E. et al. Catalytic properties of immobilized cells of methane-oxidizing and methanogenic bacteria // Adv. Biotechnol. Vol. 3 — Fermentation products / Ed. Murray Moo-Young. — New York: Pergamon press, 1981. — P. 367—372.
62. Romanovskaya V., Malashenko Yu., Grinberg T., Sokolov I. Use of mathematical methods during the cultivation of microorganisms // Proc. Third Eur. Congr. on Biotechnology / Ed. I. Weinhein, Deerfield Beach, Florida. — Basel, 1984. — Vol. 3. — P. 629—634.
63. Romanovskaya V. A., Tytov A. G., Kharchenko I., Demyanova M. Study of interdependence between monoculture in microbial association // Progress in Biotechnology: Proc. Int. Symp. INTERBIOTECH'89. — Netherlands: Elsevier, 1990. — 6. — P. 425—430.
64. Romanovskaya V. A. Taxonomy of methylotrophic bacteria // Biology of methylotrophs. — Boston: Butterworth-Heinemann, 1991. — P. 3—25.
65. Romanovskaya V. A., Alexeyev M. F., Shatikhina E. S. et al. Screening for restriction endonucleases in methane oxidizing bacteria // Микробиол. журн. — 1992. — 54, N 6. — С. 32—40.
66. Romanovskaya V. A., Sokolov I. G., Stolyar S. M., Malashenko Y. R. Role of formaldehyde in metabolism of methane oxidizing bacteria and occurrence of their HCOH-resistant mutants / Proc. Int. Conf. "Role of Formaldehyde in Biological Systems". — Sopron: Hungarian Biochemical Society, 1992. — P. 209—214.
67. Votseiko S. K., Pirog T. P., Malashenko Y. R., Grinberg T. A. A method for determining the mass-molecular composition of microbial exopolysaccharides // J. Microbiol. Meth. — 1993. — 18. — P. 349—356.

Одержано 02.06.98