

Министерство образования и науки Российской Федерации  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)  
Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства  
(Биологический институт)  
Кафедра физиологии растений и биотехнологии

ДОПУСТИТЬ К ПРЕДСТАВЛЕНИЮ ГЭК

  
Руководитель ООП  
д-р биол. наук,  
Д.С. Воробьев  
« 18 » июня 2019 г.

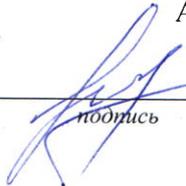
### НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах подготовленной научно – квалификационной работы  
(диссертации)

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР АЦИДОФИЛЬНЫХ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ  
БАКТЕРИЙ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК  
по основной образовательной программе подготовки научно-педагогических кадров в  
аспирантуре  
направление подготовки 06.06.01 – Биологические науки

Панова Инна Андреевна

Научный руководитель  
д-р. биол. наук, профессор  
  
О.В. Карначук  
подпись  
« 18 » июня 2019 г.

Автор работы  
аспирант  
И.А. Панова  
  
подпись

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность работы.**

Массовое внедрение биотехнологий в различные сферы промышленного производства позволяет экономно использовать природные ресурсы и увеличивать продукцию. Исследования последних лет показали, что сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) широко распространены в экосистемах, содержащих высокие концентрации металлов, таких как кислые дренажные воды и осадки хвостохранилищ отходов добычи сульфидных руд. Сульфатредуцирующие бактерии привлекают внимание исследователей как потенциальные агенты очистки сточных вод, загрязненных тяжелыми металлами и сульфатами. Использование СРБ для очистки сточных вод от тяжелых металлов рассматривается как альтернатива применяющимся химическим методам, имеющим высокую стоимость и довольно низкую эффективность.

Сульфатредуцирующие бактерии, являются продуцентами сероводорода. Он образуется в больших количествах в процессе жизнедеятельности этих микроорганизмов и связывается с ионами тяжелых металлов, образуя нерастворимые и не токсичные соединения – сульфиды ( $MeS$ ), также, сульфатредукторы потребляют протоны, вследствие чего происходит повышение рН среды. Этот процесс нашел применение в биотехнологиях очистки загрязненных металлами вод в биореакторах (Jong, Parry, 2003; Kaksonen et al., 2004; Van Houten et al., 2009; Vijmans et al., 2009; Sahinkaya et al., 2009; Nancucheo, Johnson, 2014).

Абиотические методы очистки включают обратный осмос, испарение, ионный обмен, магнитную сепарацию и добавление химических реагентов. Последний способ наиболее часто используется в технологиях ремедиации. В этом случае двухвалентное железо окисляется до трехвалентного с помощью аэрации. Затем добавляется подщелачивающее химическое вещество (такое как  $CaCO_3$ ) для повышения рН и осаждения металлов в виде гидроксидов и карбонатов (Feng et al., 2000; Weijma et al.,

2002). Вследствие такого химического осаждения образуется большое количество загрязненного тяжелыми металлами гипса, который имеет ограниченный потенциал повторного использования. Щелочные отходы должны располагаться безопасным образом, что подразумевает дополнительные затраты.

Использование СРБ для очистки кислых вод, содержащих высокие концентрации металла и часто сопровождающиеся высокими концентрациями сульфата, является эффективно доказанной технологией (Muzyer et al., 2008; Johnson, Hallberg, 2005; Valls, Lorenzo, 2002). Большинство известных СРБ являются нейтрофилами и оптимальные значения рН для их роста составляют от 6 до 8 (Widdel, 1992), несмотря на низкие значения рН в КШД, большинство сульфидогенных биореакторов работает с предварительно нейтрализованным материалом (Van Houten et al., 1994). Однако использование ацидотолерантных и ацидофильных СРБ делает возможным очищать кислые стоки напрямую, без предварительной нейтрализации. Образованные в ходе жизнедеятельности микроорганизмов сульфиды металлов представляют ценность, как продукт биоминерализации. Большинство сульфидов находят применение как полупроводниковые материалы, люминофоры, в органической химии, в медицине, для производства красок, в сельском хозяйстве и др. Важное применение имеют сульфиды меди, в основном халькоцит и ковеллит, которые используются в электротехнике (входят состав проводов), теплообменниках, вакуумных аппаратах. На сегодняшний день для получения кристаллических сульфидов металлов используют методы с применением технологий, использующих высокие температуры, токсичные вещества, а так же проводятся работы под высоким давлением, что представляет опасность. Разработка технологий биологической минерализации представляет научный интерес. В этом случае СРБ являются перспективными агентами и в этой области.

Ни один из описанных, в литературных источниках, единичных штаммов ацидофильных/ацидотолерантных СРБ, не является устойчивым к высоким концентрациям ионов металлов, которые неизменно присутствуют в стоках горнодобывающей промышленности, поэтому не могут использоваться в технологиях биоремедиации *on site* конструкции, стимулирующие естественное сообщество СРБ с целью осаждения металлов.

Таким образом, актуальность данной работы заключается в необходимости поиска и выделения новых штаммов ацидофильных/ацидотолерантных СРБ с целью использования их в качестве агентов биоремедиации и биоминерализации.

### **Цель работы:**

Поиск новых ацидофильных/ацидотолерантных штаммов сульфатредуцирующих бактерий в кислых стоках отходов добычи и обогащения металлов, а так же изучение их физиологических характеристик.

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие задачи:

1. Получить накопительные, культуры микроорганизмов, а затем выделить чистые изоляты ацидофильных/ацидотолерантных СРБ из проб, отобранных в хвостохранилищах горнодобывающих предприятий.
2. Изучить физиологические характеристики полученных штаммов СРБ (определение круга доноров и акцепторов электронов, определение температурного и рН диапазонов, устойчивости к засолению).

3. Изучить устойчивость изолятов к ионам меди и других тяжелых металлов и исследовать кристаллические фазы образованных ими сульфидов меди (II)

**Научная новизна** выполненной работы состоит в следующем:

Выделены новые изоляты ацидофильных/ацидотолерантных СРБ, относящихся к роду *Desulfosporosinus*, из осадков хвостохранилища с месторождения «Новый Берикуль» в Кузбассе, из окисленных отходов месторождения вольфрама Бом-Горхон в Забайкалье. Впервые для выделения и последующего культивирования ацидофильных СРБ использовали нестандартный источник углерода – глицерол, поскольку ранее, в литературных данных, говорилось о токсичности лактата в условиях с низкими значениями рН, а именно этот субстрат является классическим при культивировании сульфатредукторов. Чистые культуры СРБ, выделенные и охарактеризованные в ходе работы, имеют характеристики, имеющие значения в ходе их использования процессах ремедиации. Это способность к существованию в кислых экосистемах, устойчивость к металлам, способностью к использованию органических субстратов, получаемых в процессе производств, как побочный продукт. Осаждение ионов меди в виде халькопирита в процессе роста штаммов открывает возможности по разработке новых способов в отрасли биоминерализации. Штаммы могут использоваться в технологиях очистки стоков от металлов, как открытым, так и закрытым способом.

**Практическая значимость работы.**

Ацидофильные и ацидотолерантные штаммы СРБ, выделенные и охарактеризованные при выполнении работы, являются потенциальными продуцентами сульфидов металлов, которые могут найти применение при создании биотехнологий. Процессы, основанные на использовании штаммов СРБ, могут найти применение в промышленности, добывающей и перерабатывающей металлы. Данные по физиологическим характеристикам выделенных микроорганизмов являются заделом для

создания схем, связанных с технологиями очистки стоков промышленных предприятий от тяжелых металлов, а также получению сульфидов меди биотехнологическим путем.

#### **Личный вклад соискателя.**

Автором выделены чистые культуры СРБ, выполнены все эксперименты по изучению физиологических характеристик штаммов, получены сульфиды металлов. Расшифровка данных дифракционного анализа сульфидов меди и характеристика элементного состава осадков выполнена совместно с Д.В. Анциферовым. Работы с использованием молекулярных методов выполнены совместно с Л.Б. Глухой.

#### **Апробация работы**

Материалы были представлены на 10-м международном конгрессе «Extremophiles- 2014» (Санкт-Петербург, Россия, 2014 г.), а так же на 11-м международном конгрессе «Extremophiles-2016» (Киото, Япония, 2016 г.)

#### **Благодарности.**

Автор выражает благодарность сотрудникам Кафедры физиологии растений и Лаборатории биохимии и молекулярной биологии Анциферову Д.В. и Глухой Л.Б. за помощь в проведении экспериментов и расшифровке результатов. Особую благодарность автор выражает научному руководителю О.В. Карначук за неоценимую помощь в работе и обсуждении результатов.

#### **Финансовая поддержка.**

1. Исследования поддержаны Грантом Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, научных учреждениях государственных академий наук и государственных научных центрах Российской Федерации, договор от 19 марта № 14.Z50.31.0011, Нанопомпы для тяжелых металлов, 2014-2016 – исполнитель

2. Российским фондом фундаментальных исследований договор № 18-29-25041\_мк от 13.08.2018 Разнообразие и активность сульфидогенных микроорганизмов и борьба с образованием сероводорода на полигонах бытовых и сельскохозяйственных отходов - исполнитель

## **Основное содержание работы**

### **Методология и методы исследования.**

#### **Посев сульфатредуцирующих бактерий**

Посев проводили в стерильном ламинарном боксе, санация в котором проводится ультрафиолетом. Время обработки устанавливается в среднем до 45 минут. Перед посевом среду Видделя доводили до кипения и затем быстро охлаждали под струей холодной воды. Процедура проводилась для удаления растворенного в среде кислорода. В охлажденную до комнатной температуры среду вносили добавки в следующей последовательности: витамины (2 мл/ 1 л основной среды), микроэлементы (1 мл), раствор  $Se_2O_3$  и  $WO_4^{2-}$  (1 мл), органический субстрат,  $NaHCO_3$  (при внесении 10 мл рН доводится до 7,2-7,4) или 1н  $H_2SO_4$  (в нужной концентрации),  $H_2S$  (2 мл). В зависимости от посева также добавляли, раствор меди в нужной концентрации (1 мл/ 1л основной среды соответствует 50 мг/л).

Затем вносили подготовленную таким образом среду в пенициллиновые флаконы, заполняя 1/3 часть объема флакона. Причем контрольный флакон заполняли средой полностью, моментально притирали резиновую пробку и закрывали алюминиевым колпачком при помощи кремпера. В оставшиеся флаконы вносили 2-3 мл инокулята, после чего доливали средой доверху. Резиновые пробки притирали к краям флаконов с помощью стерильной иглы, что уменьшало вероятность проникновения кислорода воздуха. В конце посева флаконы с инокулятом тоже закупоривали алюминиевыми колпачками.

Культуру инкубировали в термостате при нужной температуре. Для поддержания культуры в активном состоянии следует делать пересевы по мере нарастания биомассы.

### **Получение накопительных и чистых культур**

Накопительные культуры СРП получали путем высева небольшого количества образца в жидкую пресноводную среду Видделя и создания необходимых селективных условий для роста (различные субстраты роста, рН, температура, концентрация ионов металлов). Выращивали культуры СРП в пенициллиновых флаконах, как описано выше. О наличии роста судили по появлению черного осадка сульфида железа, помутнению среды и приросту  $H_2S$  по сравнению с контролем.

Чистой культурой микроорганизмов называют потомство одной клетки. Выделение чистой культуры бактерий включает три этапа: получение накопительной культуры; выделение чистой культуры; определение чистоты выделенной культуры.

Для выделения чистой культуры использовали метод выделения отдельных колоний из столбика агара и метод предельных разведений. Для получения чистой культуры накопительную высевали на агаризованную среду Видделя методом предельных разведений и получали отдельные колонии в столбике агара. Для этого 1мл культуры в жидкой среде вносили в 9 мл агаризованной среды, помещенной в пробирку на 20 мл, тщательно перемешивали, а затем 1мл из этой пробирки вносили в 10 мл среды в другой пробирке и т.д. После этого пробирки доливались доверху и культивировались в термостате при температуре  $28^{\circ}C$ . Всего делали десять разведений.

Далее проводили выделение колоний и помещали их в жидкую среду. Выбирали пробирку с нечасто расположенными одиночными колониями, вырезали, используя стерильные иглы, петли или скальпель, такую колонию и вносили в обычную жидкую среду. Выращивали культуру

сначала в пробирке с малым объемом (5мл), затем пересевали ее в стандартный объем, а после использовали метод предельных разведений для проведения дальнейшей очистки

Для этого 1мл культуры вносили в пробирку с жидкой средой на 20 мл, тщательно перемешивали, а затем 1мл из этой пробирки вносили в 10 мл среды в другой пробирке и т.д. После этого пробирки доливались доверху и культивировались в термостате при температуре 28<sup>0</sup>С. Всего делали девять-десять разведений.

### **Микроскопирование СРБ и трансмиссионная электронная микроскопия**

Готовили препарат «раздавленная капля». С этой целью на предметное стекло наносили каплю инокулята объемом 0.2 мкл с помощью специального шприца или пипетмана со стерильным наконечником. Затем каплю накрывали покровным стеклом, поверх которого наносили небольшое количество иммерсионного масла. Проводили фазово-контрастную микроскопию культур СРП с помощью микроскопов AxioStar plus и AxioImager A1 (Carl Zeiss), применяли иммерсионный объектив A-Plan 100×, окуляр E-PI 10×/20. Микрофотосъемку осуществляли при увеличении x1000 с использованием фотосистемы AxioCam HS. Так же применялся метод трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) с использованием электронного просвечивающего микроскопа “JEM-100 CXII” (“JEOL”, Япония). Были получены микрофотографии клеток для изучения ультраструктуры бактериальных клеток.

### **Определение круга используемых доноров и акцепторов для сульфатредукции**

Для выявления доноров углерода и электрона для роста СРБ использовали различные органические субстраты. Субстрат вносили в основную среду Видделя во время посева. Проводили не менее пяти последовательных пересевов на каждом органическом субстрате. О

способности культуры использовать то или иное вещество в качестве донора электронов судили по наличию роста в пятом пересеве по сравнению с контролем. О росте судили визуально по почернению или помутнению среды и микроскопически.

### **Измерение pH среды**

pH среды во время посева измеряли с уже внесенными добавками. Использовали pH-метр HANNA HI 8314F с датчиком HI 7667. Предел допускаемой основной погрешности прибора  $\pm 0,01$  единиц pH. Калибровку прибора производили заранее, используя набор стандарт-титров для pH-метрии (HANNA) HI 7007 (pH 7.01) и HI 7004 (pH 4.01).

### **Анализ сульфидов металлов**

Сбор бактериального осадка сульфида меди проводили после продолжительной (до 15 суток) инкубации чистой культуры в присутствии ионов двухвалентной меди в концентрации 250 мг/л. Выращенный таким образом инокулят, в объеме от 120 мл, разливали в 50-мл фальконы, после предварительного фильтрования через бумажный фильтр «Белая лента» (для избавления от крупных частиц сульфида). Затем осаждали центрифугированием (5000 об. 15 минут), собирали осадок, высушивали его и помещали в 1.5-мл пластиковую пробирку для проведения серии анализов.

Анализ осадков сульфида проводили с помощью сканирующей электронной микроскопии с использованием микроскопа Philips CM30, система Quanta 200 3D (EDS) и методом рентгено-фазового анализа на дифрактометре Shimadzu XRD 6000 (Герасимчук, 2009). Использование методов рентгено-фазового анализа позволило получить расшифрованные дифракционные картины кристаллических сульфидов и подробный минералогический состав сульфидов.

## Молекулярные методы

ДНК из культур СРП выделяли с использованием кита MOBIOPowerSoilDNAKit (MOBIOLaboratories, Inc, Carlsbad, CA) в соответствии с инструкцией производителя. Для определения филогенетической принадлежности Bacteria в культурах использовали разделение ПЦР-амплифицированных фрагментов гена 16SpPНК методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ПЦР-ДГГЭ). Для подготовки фрагментов к разделению применяли «вложенную» ПЦР. Продукты ПЦР-реакции с парой праймеров 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') -1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (DeLong, 1992; Weisburgetal, 1991) использовали в качестве матрицы в последующей реакции с праймерами BacV3f (Weisburgetal, 1991) и 907r. Прямой праймер содержал GC-последовательность (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCC-3') (Lane, 1991). ПЦР-смесь (объемом 50 мкл) содержала 1xTaq-буфер (Fermentas, Литва), 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Литва), 100 мкМ смеси dNTP (Fermentas, Литва), 1.25 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas, Литва), 0.2 мкМ праймеры (ЗАО «НПФ Синтол», Москва).

Разделение амплифицированных фрагментов ДНК проводили с использованием системы DCodeSystem (BioRad) в линейном градиенте мочевины и формамида от 40% до 60% (100% денатурирующий раствор содержит 7М мочевины и 40% формамид) в 8% акриламидном геле. Электрофорез проводили при 60°C, 110 V в течение 19 часов в 1xTAE-буфере. Фрагменты геля промывали стерильной водой без нуклеаз (Fermentas) при комнатной температуре в течение 2 часов, а затем экстрагировали ДНК при 4°C в течение 12 часов. Полученные фрагменты гена 16SpPНК использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами BacV3f и 907r. Прямой праймер в этом случае не содержал GC последовательности. Присутствие ПЦР-продукта до и после проведения

ДГГЭ визуализировали в 1% агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием.

Для определения последовательности нуклеотидов гена 16SpPHK чистой культуры СРП проводили амплификацию с использованием пары праймеров 27F (5'-AGA GTT TGATCC TGG CTC AG-3') и 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') по описанным ранее протоколам (Карначук с соавт, 2009). Секвенирование фрагментов ДНК проводили коммерчески в ООО «НПФ Синтол» (Москва). Анализ последовательностей проводили с использованием программы BioEdit и инструмента BLASTGenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul, 1997). Филогенетический анализ проводили с использованием пакета MEGA6 (Tamuraetal, 2013).

### **Результаты и обсуждение**

#### **Получение накопительных культур и чистых изолятов СРБ из образцов проб Ха 201 и ВG**

Из образцов пробы Ха 201 были получены накопительные культуры СРБ, выращенные на глицероле (в качестве источника углерода и электронов). Бактерии культивировались на стандартной для СРБ среде Видделя при температуре 28<sup>0</sup>С, с рН 3 и концентрацией Cu<sup>2+</sup> 200 мг/л. Из образца, обозначенного «ВG», получили накопительную культуру, растущую на среде с лактатом при начальной концентрации Mo<sup>2+</sup> и Cu<sup>2+</sup> 200 мг/л и рН 3.1. Был проведен ряд последовательных пересевов методом предельных разведений на среду с глицеролом и низкими значениями рН (1.3-2). Снижение рН среды до более низких значений по сравнению с исходными накопительными культурами проводили с целью очистки культуры, обладающей максимальной устойчивостью к высокой концентрации протонов. Затем с обеими линиями накопительных культур провели серию предельных разведений, используя глицерол в качестве субстрата роста, начальное значение рН=2. После 3 циклов титрования провели прогрев 90<sup>0</sup>С в течении 30 минут.

После прогрева культуры выглядели морфологически однородно. Секвенирование гена 16S рРНК подтвердило, что штаммы BG и I2 были генетически однородны и оба принадлежали к роду *Desulfosporosinus*.

Штамм BG представлен неподвижными палочками, прямыми или слегка изогнутыми, длиной 1.5 – 3.5 мкм и шириной 0.75 – 1.0 мкм. В стационарной фазе роста культура образовывала овальные споры, расположенные субтерминально. Культура росла при начальном рН = 2 с лаг-фазой 10 суток.

Штамм I2 (полученный из пробы Ха 201) представляет собой слегка изогнутые подвижные палочки длиной 3-6 мкм и шириной 0,5-1,0 мкм. Часто встречаются споры овальной формы, слегка набухающие в клетке. Начальный рН среды имеет значение 2.63, лаг-фаза составляет 7 суток.

### **Физиологические характеристики штаммов *Desulfosporosinus* sp. I2 и *Desulfosporosinus* sp. BG**

#### **Изучение способности *Desulfosporosinus* sp. I2 и *Desulfosporosinus* sp. BG к утилизации различных органических субстратов**

В целях определения оптимальных условий для роста культур и их физиологических характеристик исследовали способность к утилизации различных органических субстратов в качестве доноров электрона и углерода. В ходе исследования выявили возможность использования круга субстратов для роста данных штаммов. Наиболее интенсивный рост *Desulfosporosinus* sp. I2 наблюдается, помимо глицерола, на этаноле, бутаноле, лактате, пирувате, малате, сукцинате, формиате, пальмитате, используется пептон и триптон. Чуть меньшая интенсивность роста при добавлении цитрата и никотиновой кислоты. Слабый рост при внесении ацетата. Не наблюдался рост при добавлении сахаров (глюкозы, сахарозы, фруктозы), пропанола, бутирата, фумарата и целлюлозы. В качестве акцепторов используются: сульфат, тиосульфат и сера элементная. Штамм *Desulfosporosinus* sp. BG активно использует ацетат в качестве донора

электронов, что не характерно для представителей рода *Desulfosporosinus* spp., также штамм прекрасно утилизировал сахарозу; активное накопление биомассы наблюдалось и при внесении следующих веществ: этанол, бутанол, глицерол, лактат, пальмитат, пируват. Слабый рост отмечен на цистеине и пропаноле, отсутствует совсем при использовании бензоата, пропионата, бутирата и никотиновой кислоты в качестве доноров углерода. Акцепторами для данного штамма явились: сульфат, сульфит и тиосульфат.

### **Влияние кислотности среды на рост штаммов *Desulfosporosinus* sp. I2 и *Desulfosporosinus* sp. BG**

Изначально штамм *Desulfosporosinus* sp. I2 выделен при pH=3. Однако рост наблюдался при понижении значений pH до 1.7 и только после этого рост культуры прекращался. Наблюдали активный рост при pH=2.5 и 3.5 (около 7 суток), менее активный рост при pH=4. и 4.5. При смещении pH в сторону больше, чем pH=5, рост очень сильно замедляется, практически пропадает. Характер роста штамма говорит о том, что он является облигатным ацидофилом. Оптимумом является значение pH = 2.63.

Штамм *Desulfosporosinus* sp. BG тоже является облигатным ацидофилом, однако проявляет более высокие требования к значению pH. Пороговыми значениями являются pH = 1,1 для «нижней» границы и pH = 4,8 для «верхней», активный рост наблюдается в диапазоне значений pH = 2.0 – 3,5 с оптимумом pH = 2.0.

### **Температурный оптимум и устойчивость к засолению.**

Штаммы культур имеют одинаковый температурный оптимум +28°C. *Desulfosporosinus* sp. I2 имеет температурный диапазон в пределах +15°C – +37°C, лаг-фаза составляла 25 суток при температуре +15°C, 15 суток при +20°C, 7-10 суток при +28°C и 20 суток при +37°C. Рост культуры ингибируется в присутствии NaCl, в концентрации 2% в среде. Характер роста ухудшается в процессе повышения концентрации NaCl, оптимум значения 0,1% солености среды.

*Desulfosporosinus* sp. BG имеет аналогичный температурный диапазон, однако скорости роста несколько иные: при температуре +15<sup>0</sup>С лаг-фаза составляет 30 суток, +20<sup>0</sup>С – 20-25 суток, +28<sup>0</sup> – 10-14 суток, +37<sup>0</sup>С – 25 суток. Для этого штамма так же показана возможность роста при +4<sup>0</sup>С, лаг-фаза составила порядка 65 дней. Штамм I2 ростовых процессов при данной температуре не проявил. Однако данная температура не является губительной для обоих штаммов и используется с целью сохранения накопленной клеточной биомассы от лизиса. Ингибирующая концентрация NaCl для штамма BG равна 1%. Оптимум также составляет 0,1% солености среды.

### **Изучение устойчивости штаммов *Desulfosporosinus* sp. I2 и *Desulfosporosinus* sp. BG к ионам меди**

Для изучения устойчивости к ионам двухвалентной меди культуры высевали на среды с постепенным повышением содержания ионов Cu (II) (от 50 до 9000 мг/л) с целью адаптации штамма к повышенным концентрациям меди. Штамм I2 проявляет значительную устойчивость к ионам меди в среде (до 8000 мг/л, или 126 мМ) при рН, равном 2,63. Штамм BG оказался менее устойчивым по сравнению с I2, однако в сравнении с остальными известными устойчивыми организмами он проявляет высокую степень резистентности к ионам меди (II) (до 5000 мг/л или 78мМ). Из анаэробов, используемых для очистки сточных вод, наибольшей устойчивостью обладал метаноген *Methanobacterium bryantii*, растущий при максимальной концентрации двухвалентной меди 1,8 мМ. Из устойчивых к ионам двухвалентной меди сульфатредукторов известен *Desulfovibrio* sp. R2, способный к росту в присутствии 800 мг Cu(II)/л (12,5мМ) (Karnachuk et al., 2009). Резистентность к меди штамма R2 обусловлена присутствием плазмиды, несущей rco-ген.

Повышение концентрации двухвалентной меди вызывало увеличение продолжительности лаг-фазы от нескольких суток до нескольких недель,

что может быть связано с синтезом специфических белков, ответственных за устойчивость к меди, для индукции и синтеза которых необходимо определенное время.

Для изолятов I2 и BG показана устойчивость и к другим тяжелым металлам, которые являются токсичными. Так штамм *Desulfosporosinus* sp. I2 резистентен к следующим концентрациям металлов:  $\text{Co}^{2+} = 500$  мг/л,  $\text{Cd}^{2+} = 250$  мг/л,  $\text{Ni}^{2+} = 1000$  мг/л также в процессе исследований определена устойчивость к  $\text{As}^{3+} = 5$  мг/л,  $\text{Zn}^{2+} = 250$  мг/л,  $\text{Li} = 150$  мг/л. Штамм *Desulfosporosinus* sp. BG проявляет устойчивость к следующим концентрациям металл-ионов в среде:  $\text{Co}^{2+} = 300$  мг/л,  $\text{Cd}^{2+} = 200$  мг/л,  $\text{Ni}^{2+} = 300$  мг/л,  $\text{Zn}^{2+} = 250$  мг/л,  $\text{Li} = 100$  мг/л.

#### **Изучение образования сульфидов меди двухвалентной штаммом *Desulfosporosinus* sp. I2 и *Desulfosporosinus* sp. BG на среде с глицеролом**

Изучение ультраструктуры бактериальных клеток *Desulfosporosinus* sp. I2 (Рисунок 1А и 1Б) показало способность штамма к образованию кристаллов сульфида меди различной формы. Выявлены осадки сульфидов меди шаровидной формы, окружающие клетки (Рисунок 1А). Часть сульфидов меди имеет тонкую игольчатую форму (Рисунок 1Б). Анализ микрофотографий штамма *Desulfosporosinus* sp. BG, показал, что данная культура накапливает ионы меди внутри клеток, в виде глобул. Возможно штамм имеет механизмы перевода токсичных ионов в неактивную форму при помощи аминокислот или белков. Сульфиды концентрируются, в основном, у края клетки, но присутствуют включения и по всей площади клетки.

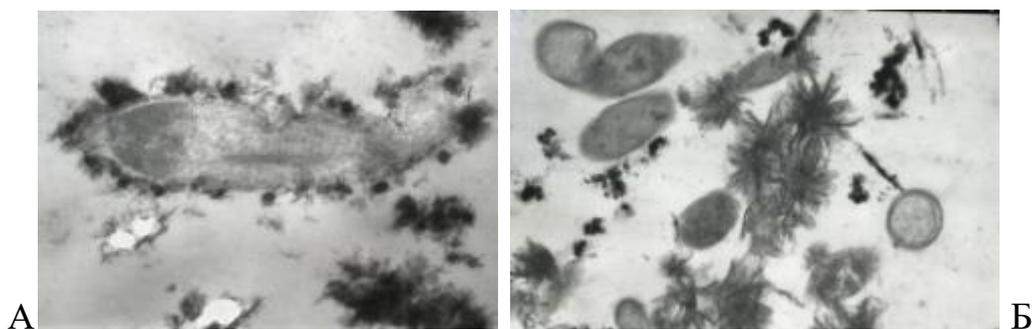


Рисунок 1 – Микрофотографии клеток штамма *Desulfosporosinus* sp. I2, окруженные сульфидом меди шаровидной формы (А); клетки *Desulfosporosinus* sp. I2 с сульфидами меди игольчатой формы (Б) (трансмиссионная электронная микроскопия, масштаб 0.5 мкм).

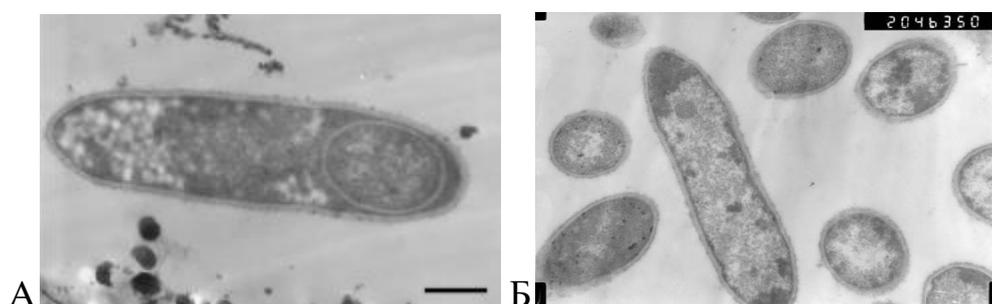


Рисунок 2 – Микрофотографии клеток штамма *Desulfosporosinus* sp. BG, ультратонкие срезы клеток на среде без меди (А); в присутствии 250мг/л  $\text{Cu}^{2+}$  (трансмиссионная электронная микроскопия, масштаб 0.5 мкм).

Был проведен анализ осадков сульфидов, образованных культурой *Desulfosporosinus* sp. I2, с помощью сканирующей электронной микроскопии. Анализ показал, что основными элементами, содержащимися в осадке, были Cu, Fe, S. Также присутствовали P, O и C. Соотношение атомного веса обнаруженных элементов позволяет предположить присутствие в осадке сульфидов меди состава CuS, фосфатов железа и возможно, карбонатов железа.

Анализ осадков сульфидов, образованных культурой *Desulfosporosinus* sp. BG показал, что основными элементами, содержащимися в осадке, так же были Cu, Fe, S, однако в связи с тем, что ионы меди, в основном, остаются в клетке, содержание меди в осадке меньше, чем у штамма I2. Аналогично присутствуют P, O и C.

Рентгено-фазовый анализ, проведенный с помощью дифрактометра Shimadzu XRD 6000, позволил выявить наличие кристаллических сульфидов меди, образованных в процессе роста штаммов I2 и BG. Основными фазами, обнаруженными в осадках, были халькопирит ( $\text{CuFeS}_2$ ) и тенорит ( $\text{CuO}$ ). Были найдены другие фазы, процентное содержание которых было очень мало, а именно путоранит -  $\text{CuFeS}_2$ , (кубическая решетка молекулы), гирит -  $\text{Cu}_8\text{S}_5$ , борнит -  $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$  и ярровит -  $\text{Cu}_9\text{S}_8$ .

Анализ сульфидов, образованных в процессе роста культуры *Desulfosporosinus* sp. BG выявил наличие основных фаз, представленных халькопиритом -  $\text{CuFeS}_2$  и ковеллитом –  $\text{CuS}$ , а также вторичные вещества лепидокрокит -  $\text{FeO}(\text{OH})$ , гуилдит -  $\text{CuFe}(\text{SO}_4)_2(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_4$ .

Обнаружено, что при культивировании штаммов образовывается халькопирит, тогда как при культивировании быстрорастущих штаммов в течение недели, основной фазой является ковеллит и появляются только следы халькопирита. Возможно, это связано с тем, что ковеллит - неустойчивая форма сульфида меди, которая переходит в форму халькопирита, более устойчивую.

В химических контролях сульфиды меди не были обнаружены. Химический контроль представлял собой среду без клеток, куда вносили  $\text{Na}_2\text{S}$ , до концентрации 100 мг/л – средней концентрации сероводорода, типичной для активно растущих культур СРБ, а также ионов двухвалентной меди в концентрации 250 мг/л. При десяти- и пятнадцатидневном инкубировании контролей, кристаллической фазы не обнаружено, но при более длительном инкубировании (58 дней) появлялись кристаллы элементной меди, оксида меди – куприта, и незначительные следы халькоцита -  $\text{Cu}_2\text{S}$ . Отсутствие сульфидов меди в химических контролях, которые инкубировались в течении 10 и 15 суток, позволяет говорить о том, что полученные сульфиды меди, были образованы в процессе жизнедеятельности бактерии *Desulfosporosinus* sp. I2 и *Desulfosporosinus* sp. BG.

Сравнив полученные результаты с данными по исследованию образования сульфидов меди на традиционном субстрате лактате, можно сделать вывод, что состав и структура сульфидов не зависит напрямую от выбора субстрата роста. Однако, выгоднее использовать более перспективный с экономической точки зрения субстрат для продукции биомассы, если штамм является активным потребителем глицерола, так как скорость образования и качество сульфидов зависит от интенсивности роста микробной биомассы.

## **Выводы**

1. Выделены чистые изоляты сульфатредуцирующих бактерий из отходов горнодобывающих предприятий. Оба представителя принадлежат к роду *Desulfosporosinus*, проявляют выраженные ацидотолерантные свойства, имеют высокую индуцибельную устойчивость к тяжелым металлам, а также активно используют глицерол, что делает их перспективными агентами для технологий биоремедиации.
2. Определены физиологические характеристики выделенных изолятов, исследован круг доноров и акцепторов электронов, выявлены наиболее предпочтительные для использования вещества, определен диапазон значений pH, полученные данные свидетельствуют о том, что штаммы принадлежат к ацидофильным организмам. Получены данные о температурном диапазоне – новые микроорганизмы являются мезофилами, а также данные о процентном содержании ионов NaCl в среде из которых видно, что *Desulfosporosinus* sp. I2 и *Desulfosporosinus* sp. BG. имеют не высокую степень устойчивости к засолению, что характерно для представителей этого рода

3. Изучена устойчивость изолятов к ионам меди и других тяжелых металлов и исследованы кристаллические фазы образованных ими сульфидов меди (II). Штаммы показали высокую степень устойчивости к присутствию ионов двухвалентной меди в среде. Рентгенофазовый анализ осадков, образованных культурами при росте в присутствии меди (начальная концентрация  $\text{Cu}^{2+}$  250 мг/л), показал присутствие кристаллических сульфидов меди – ковеллита и халькопирита.

**Список работ опубликованных по теме работы, входящих в издания, индексируемые РИНЦ, Scopus, Web of science:**

1. Mardanov A.V., Panova I.A., Beletsky A.V., Avakyan M.R., Kadnikov V.V., Antsiferov D.V., Banks D., Frank Y.A., Pimenov N.V., Ravin N.V., Karnachuk O.V. Genomic insights into a new acidophilic, copper-resistant *Desulfosporosinus* isolate from the oxidized tailings area of an abandoned gold mine //FEMS Microbiology Ecology. 2016. Vol. 92, № 8. P. 1-36.
2. Olga Karnachuk, Marat Avakyan, Inna Kurganskaya, Marina Kazakovtseva, Anna Gerasimchuk. Genomic insight into acidophilic sulfate reduction //Extremophiles 2014. Book of abstracts. 10th International Congress on Extremophiles (Russia, Saint-Petersburg 07.09.2014-11.09.2014). St. Petersburg, Russia, 2014. P. 72. флеш-накопитель.
3. Olga Karnachuk, Olga Ikkert, Dmitry Antsiferov, Tatyana Fyodorova, Inna Panova, Anastasiia Kovalyova, Marina Bushuieva, Aleksandra Zakharova, Nikolai Ravin, Olli H. Tuovinen. Novel acidophilic, metal-tolerant sulfate-reducing bacteria can produce nano-size transition metal sulfides //Extremophiles2016: Book of Abstracts. 11th International Congress on Extremophiles (Kyoto,

- Japan, 12-16 September, 2016). Kyoto, Japan, 2016. P. 330. флеш-накопитель.
4. Olga V. Karnachuk, Vitalii V. Kadnikov, Inna A. Panova, Andrey V. Mardanov, Alexey V. Beletsky, Erhzena V. Danilova, Marat R. Avakyan, Nikolai V. Ravin. Genome sequence of the copper resistant and acid-tolerant *Desulfosporosinus* sp. BG isolated from the tailings of a molybdenum-tungsten mine in the Transbaikal area //Genomics Data. 2017. Vol. 11. P. 106-108.
  5. Герасимчук А.Л., Курганская И.А., Франк Ю.А., Иккерт О.П., Бухтиярова П.А., Лопушняк Ю.М., Данилова Э.В. Изучение физико-химических характеристик кислых отходов добычи сульфидов металлов и поиск сульфидогенных бактерий, перспективных для осаждения металлов //Проблемы региональной экологии. 2013. № 6. С. 112-119.
  6. Карначук О.В., Курганская И.А., Авакян М.Р., Франк Ю.А., Иккерт О.П., Филенко Р.А., Данилова Э.В., Пименов Н.В. Ацидофильный *Desulfosporosinus* из окисленных отходов добычи металлов в Забайкальском крае //Микробиология. 2015. Т. 84, № 5. С. 595-605.

Введите текст:

...или загрузите файл:

Файл не выбран...

Выбрать файл...

Укажите год публикации: 2019 ▾

Выберите коллекции

Все

Рефераты

Авторефераты

Иностранные конференции

PubMed

Википедия

Российские конференции

Иностранные журналы

Российские журналы

Энциклопедии

Англоязычная википедия

Анализировать

Год публикации: 2019.

Оценка оригинальности документа - 94.95%

Процент условно корректных заимствований - 0.0%

Процент некорректных заимствований - 5.05%

Время выполнения: 6 с.

Документы из базы

Источники заимствования

### 1. Сульфатредуцирующие бактерии в экосистемах с экстремальными значениями pH (<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01003485742?get=pdf>)

Авторы: Герасимчук, Анна Леонидовна.

Год публикации: 2009. Тип публикации: автореферат диссертации.

<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01003485742?get=pdf> (<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01003485742?get=pdf>)

Показать заимствования (10)

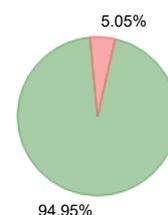
### 2. Выделение и изучение сульфатредуцирующих бактерий из экосистем, подверженных влиянию металлургических предприятий (<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01003281722?get=pdf>)

Авторы: Франк, Юлия Александровна.

Год публикации: 2006. Тип публикации: автореферат диссертации.

<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01003281722?get=pdf> (<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01003281722?get=pdf>)

Показать заимствования (5)



Категория	Процент
В списке литературы	4.17%
Источники заимствования	1.86%

4.17%

1.86%

Дополнительно

[Значимые оригинальные фрагменты](#)

[Библиографические ссылки](#)

[Искать в Интернете](#)

© 2015-2019 Институт системного анализа Российской академии наук (<http://www.isa.ru/index.php?lang=ru>)