

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**СОВРЕМЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ
И БИОТЕХНОЛОГИЯ
ГЛАЗАМИ МОЛОДЫХ ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ**

Материалы Всероссийской научной конференции
2–4 апреля 2014 г.

*Конференция организована при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований
(грант № 14-04-06806 мол_г_1)*

Томск
Издательский Дом
Томского государственного университета
2014

НОВЫЙ АЦИДОТОЛЕРАНТНЫЙ ШТАММ *DESULFOVIBRIO*, ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ КИСЛЫХ ОТХОДОВ МЕСТОРОЖДЕНИЯ «ЦЕНТРАЛЬНЫЙ», КУЗБАСС

М.А. Власова, А.Л. Герасимчук, О.В. Карначук
Кафедра физиологии растений и биотехнологии,
Томский государственный университет, Томск

Кислые шахтные дренажные воды (КШД), образующиеся в местах добычи и хранения отходов сульфидных руд и характеризующиеся помимо низких значений pH высокими концентрациями растворенных металлов и сульфатов, являются местообитанием экстремофильных микробных сообществ. Серу- и железо-окисляющие микроорганизмы составляют значительную часть сообщества в подобных экосистемах и способствуют образованию КШД. Важной составляющей ацидофильных микробных сообществ является группа сульфатредуцирующих бактерий (СРБ), представители которых обладают способностью осаждать тяжелые металлы из раствора с помощью биогенного сероводорода, способствуя тем самым обезвреживанию КШД. Несмотря на то, что представители СРБ часто обнаруживают в КШД молекулярными и культуральными методами, полученные чистые культуры чаще всего не росли при кислых значениях pH. Немногочисленные ацидотолерантные штаммы СРБ преимущественно относятся к спорообразующим представителям рода *Desulfosporosinus*. Поиск и изучение новых ацидофильных СРБ представляет большой научный интерес. Темой данного исследования явилось выделение и изучение ацидотолерантной СРБ из КШД.

В работе использовали пробы осадков, полученных с территории хвостохранилища золоторудного месторождения «Центральное» (Тисульский район, Кузбасс) в августе 2011 г. Для выделения новых СРБ использовали пробу кислых осадков сайта, обозначенного ТомС, нижний восстановленный слой которых обладал признаками сульфатредукции (черный цвет осадков, запах сероводорода). Значение pH восстановленного слоя осадков составляло 5.2, Eh -386 mV. Были получены накопительные культуры на стандартной пресноводной среде Видделя (Widdel, Back, 1992) с лактатом в качестве ростового субстрата и добавлением 25 мг/л ионов меди. Культивирование проводили при температуре 28С° при кислых значениях pH (3.5-3.8) и близких к нейтральным (6.8). Продолжительность лаг-фазы обеих культур не превысила 5 суток.

Наблюдали визуальные признаки протекания сульфатредукции и образования черного осадка, вероятно сульфида железа. Обе накопительные культуры отличались широким морфологическим разнообразием клеток. Встречались палочки разных размеров, одиночные, делящиеся и в цепочках, споры, вибрионы и спиралевидные клетки. Для продолжения работ по выделению чистой культуры СРБ была выбрана ацидотолерантная накопительная культура. Был проведен ряд последовательных пересевов смешанной культуры на низком значении рН (3) методом предельных разведений. В результате была получена морфологически однородная культура, представленная подвижными вибрионами (ТомС_1). Следует отметить, что в зависимости от условий и продолжительности культивирования, морфология клеток культуры ТомС_1 могла меняться. При продолжительном культивировании бактериальные клетки выглядели как седловидные палочкообразные клетки с заостренными концами. Однако секвенирование фрагментов гена 16S рНК бактерий с разных стадий культивирования подтвердило однородность и чистоту культуры.

Анализ близкой к полной последовательности гена 16S рНК длиной 1424 п.о. показал принадлежность выделенного нами штамма ТомС_1 к роду *Desulfovibrio*. Филогенетический анализ показал наиболее близкое родство штамма (98% сходства последовательностей ДНК) с видами *Desulfovibrio aerotolerans*, *D. magneticus*, *D. carbinolicus* и *D. burkinensis*. Все эти виды растут при нейтральных значениях рН, однако родственные им микроорганизмы обнаруживались в биореакторах (с нейтральными значениями рН) по очистке кислых шахтных дренажей [1]. Представители дельтапротеобактериальных СРБ обнаруживают в экосистемах КШД в основном молекулярными методами [2-4]. Немногочисленные чистые культуры *Desulfovibrio*, выделенные из КШД, росли при нейтральных рН [5]. Минимальные значения рН для роста штамма, родственного *Desulfovibrio*, составляли 5,5 [6]. Выделенный нами штамм *Desulfovibrio* ТомС_1 способен к росту в широком диапазоне рН, от 2 до 7. Наиболее быстрый рост (визуальная продолжительность лаг-фазы в среднем около 4 суток) отмечен при начальном рН 3. При значениях рН от 4 до 7, а также при начальном рН 2 продолжительность лаг-фазы увеличивалась на 1-2 суток. Однако при росте на нейтральных значениях рН (6-7) отмечено увеличение числа подвижных форм клеток и численности в целом. Штамм ТомС_1 хорошо рос в присутствии 25 мгCu/л. К настоящему моменту показана устойчивость к ионам меди до 50 мг/л и, вероятно, эта концентрация не является предельной для роста штамма ТомС_1. Устойчивость к металлам известна для разных видов и

штаммов *Desulfovibrio* [7-9]. Например, для родственного нашей бактерии штамма *Desulfovibrio magneticus* RS-1 описана способность осаждать кадмий из ростовой среды при начальной концентрации 1.3 ppm (минимальная ингибирующая концентрация) [10]. Кроме того, в опубликованном геноме этого вида [11] мы обнаружили присутствие семейства белков металл-транспортирующих АТФаз Р-типа (NC_012796), что косвенно свидетельствует об устойчивости к металлам.

Таким образом, выделенный из отходов добычи золота штамм *Desulfovibrio* отличался от других известных представителей этого рода широким диапазоном pH для роста и устойчивостью к низким значениям pH (до 2). Сходство близкой полной последовательности гена 16S рРНК штамма ТомС_1 с ближайшими родственными видами составило 98%, что может свидетельствовать о принадлежности к новому виду. Ацидотолерантный характер роста и устойчивость к ионам меди *Desulfovibrio* sp. ТомС_2 делает этот штамм перспективным для изучения осаждения сульфидов металлов и применения в очистке загрязненных сточных вод и КШД.

Литература

1. Zamzow K.L. 2007. Microbial communities utilizing biodiesel waste and ethanol and treatment of acid mine drainage. Ph. D. Thesis. [electronic resource] <http://books.google.ru/books?id=EcV93b5S AwEC&lpg=PP1&hl=ru&pg=PR5#v=onepage&q&f=true>.
2. Bond P.L., Smriga S.P. and Banfield J.F. 2000. Phylogeny of microorganisms populating a thick, Subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Appl. Environ. Microb.* V. 66. P. 3842-3849.
3. Bruneel O., R. Duran, C. Casiot, F. Elbaz-Poulichet, J.-C. Personne. 2006. Diversity of microorganisms in Fe-As-rich acid mine drainage waters of Carnoules, France. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 72. № 1. P. 551-556.
4. Hao C., Zhang H., Haas R., Bai Z. and Zhang B. 2007. A novel community of acidophiles in an acid mine drainage sediment. *World J. Microbiol. Biotechnol.* V. 23. P. 15-21.
5. Kaksonen A.H., Plumb J.J., Robertson W.J., Franzmann P.D., Gibson J.A.E. and Puhakka J.A. 2004. Culturable diversity and community fatty acid profiling of sulfate-reducing fluidized-bed reactors treating acidic, metal-containing wastewater. *Geomicrobiol. J.* V. 21. P. 469-480.

6. Rampinelli L.R., R.D. Azevedo, M.C. Teixeira, R. Guerra-Sá, V.A. Leão. 2008. A sulfate-reducing bacterium with unusual growing capacity in moderately acidic conditions. *Biodegradation*. V. 19. P. 613-619.

7. Karnachuk O.V., Kurochkina S.Y., Nicomrat D., Frank Yu.A., Ivasenko D.A., Phyllipenko E.A., and Tuovinen O.H. 2003. Copper resistance in *Desulfovibrio* strain R2. *Antonie van Leeuwenhoek*. V. 83. P. 99-106.

8. Karnachuk O.V., K. Sasaki, A.L. Gerasimchuk, O. Sukhanova, D.A. Ivasenko, A.H. Kaksonen, J.A. Puhakka, and O.H. Tuovinen. 2008. Precipitation of Cu-sulfides by copper-tolerant *Desulfovibrio* isolates. *Geomicrobiology J.* V. 25. P. 219-227.

9. Mancini S., Abicht H.K., Karnachuk O.V., Solioz M. 2011. Genome sequence of *Desulfovibrio* sp. A2, a highly copper resistant, sulfate-reducing bacterium isolated from effluents of a zinc smelter at the Urals. *J. Bacteriol.* V. 193(23). P. 6793-6794.

10. Arakaki A., H. TAakeyama, T. Tanaka, and T. Matsunaga. 2002. Cadmium recovery by a sulfate-reducing magnetotactic bacterium, *Desulfovibrio magneticus* RS-1, using magnetic separation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* V. 98-100. P. 833-840.

11. Nakazawa H., Arakaki A., Narita-Yamada S., Yashiro I., Jinno K., Aoki N., Tsuruyama A., Okamura Y., Tanikawa S., Fujita N., Takeyama H., Matsunaga T. 2009. Whole genome sequence of *Desulfovibrio magneticus* strain RS-1 revealed common gene clusters in magnetotactic bacteria. *Genome Res.* V. (10). P. 1801-1808.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Н.А. Кичеева, Е.С. Пальчевская, И.Ю. Хохлова
Томский политехнический университет, Томск

На сегодняшний день актуальна проблема введения новых антибиотических препаратов в связи с появлением резистентных штаммов микроорганизмов. Пиоцианин можно использовать в качестве антибиотического препарата в медицине и ветеринарии при терапии заболеваний, вызванных *Bacillus subtilis*, *Moraxella lacunata*, *Shigella flexneri* [1], а также в растениеводстве в качестве биопестицидов при борьбе с фитопатогенными бактериями и грибами. Данный пигмент может использоваться в качестве переносчиков электронов [2].