На правах рукописи

Франк Юлия Александровна

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ ИЗ ЭКОСИСТЕМ, ПОДВЕРЖЕННЫХ ВЛИЯНИЮ МЕТАЛЛУРГИЧЕСКИХ ПРЕДПРИЯТИЙ

03.00.16 - Экология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск - 2006

Работа выполнена на кафедре физиологии растений и биотехнологии ГОУ ВПО Томский государственный университет

Научный руководитель: кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Ольга Викторовна Карначук

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор Евгений Васильевич Евдокимов

кандидат биологических наук, доцент Лидия Ивановна Сваровская

Ведущая организация: Томский Политехнический университет

Защита диссертации состоится «15» ноября 2006 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.267.10 при Томском государственном университете по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Томского государственного университета

Автореферат разослан «04» октября 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук Е.Ю. Просекина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Загрязнение вод тяжелыми металлами - одна из наиболее серьезных проблем окружающей среды России (Государственный доклад «О состоянии окружающей природной среды Российской Федерации», 1998). Интенсивные шахтные разработки в северных регионах и гигантские плавильные производства на Урале, в Норильске и на Кольском полуострове долгое время осуществлялись без учета их воздействия на окружающую среду, что вызвало мощные загрязнения металлами прилегающих экосистем.

В местах действующих и заброшенных шахт образуются кислые дренажные воды. Они содержат большое количество тяжелых металлов и сульфатов, а также имеют низкий pH, являющийся результатом окисления сульфидов металлов. В настоящее время широко распространены химические методы обезвреживания сульфат- и металлсодержащих сточных вод. Стоимость подобных процессов велика при не очень высокой эффективности удаления сульфата и металлов (Boonstra et al., 1999). Биологическая очистка вод, содержащих металлы, имеет несколько существенных преимуществ по сравнению с химическими методами, таких как сравнительно низкая стоимость, высокая эффективность удаления металлов и возможность повторного использования извлеченных металлов.

Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) привлекают внимание исследователей как потенциальные агенты очистки различных сред, загрязненных тяжелыми металлами и сульфатами. В ходе своей жизнедеятельности они восстанавливают сульфаты (White et al., 2000). Продукт сульфатредукции – сероводород – реагирует с ионами тяжелых металлов с образованием нерастворимых сульфидов металлов. Благоприятным фактором является редукция растворимых токсических металлов до менее токсичных или менее растворимых форм. Сульфатредукторы не только эффективно осаждают тяжелые металлы путем продукции сероводорода, но и естественным путем повышают щелочность среды, переводя серную кислоту в сульфид (Johnson, 2000).

Токсичность ионов металлов для микроорганизмов - одно из главных ограничений применения ремедиационных технологий (Johnson, 2000). Сульфатредуцирующие бактерии проявляют повышенную устойчивость к тяжелым металлам (Karnachuk et al., 2003; Karnachuk et al., 2005), однако, кинетика роста чистых культур сульфатредукторов и ингибирования их роста ионами меди (II) остается малоизученной. В условиях умеренного и бореального климата существует перспектива выделения и использования СРБ, устойчивых к низким температурам (Banks et al., 1997). В настоящее время применение микроорганизмов для очистки окружающей среды в период с осени до весны ограничено из-за низких температур. Одним из путей преодоления данного ограничения может быть использование для биоремедиации психротолерантных микроорганизмов.

Актуальной задачей при изучении чистых культур и сообществ микроорганизмов – агентов природоохранных технологий - является также поиск эффективных и экономически выгодных субстратов для роста. Наличие органических веществ - доноров и акцепторов электронов для сульфатредукции – одно из важнейших условий обеспечения жизнедеятельности для большинства СРБ. Исследователи указывают на возможность стимуляции активности сульфатредукторов в биореакторных системах путем внесения определенных органических веществ (Kaksonen et al., 2004). Нерастворимые природные фосфаты, например фосфориты, представляют собой более дешевые ростовые субстраты по сравнению с растворимыми. Способность к утилизации природных нерастворимых фосфатов – важный механизм, обеспечивающий конкурентоспособность СРБ при биоремедиации загрязненных водных экосистем, лимитированных по содержанию фосфора.

В последние годы возрос интерес к изучению возможностей стимулирования активности аборигенной микрофлоры в загрязненных местообитаниях. Целью подобных исследований является поиск новых путей развития биоремедиационных технологий. В связи с этим, данные о численности и разнообразии СРБ в низкотемпературных экосистемах, загрязненных стоками металлургических производств, представляют особую ценность.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования являлось выделение и изучение СРБ, перспективных для использования в технологиях очистки вод от металлов, а также определение их численности и разнообразия в загрязненных экосистемах. Для достижения цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Определить численность СРБ в осадках влажных местообитаний, загрязненных стоками металлургических предприятий в Норильске и на Кольском полуострове;
2. Исследовать разнообразие и состав сообщества культивируемых СРБ в загрязненных влажных осадках;
3. Выделить чистые культуры СРБ из осадков, загрязненных стоками металлургических предприятий в Норильской промышленной зоне и на Кольском полуострове, изучить их фенотипические и филогенетические характеристики;
4. Изучить филогенетические характеристики чистых культур, выделенных ранее из сточных вод Челябинского металлургического

комбината, и определить оптимальные органические субстраты – доноры углерода и электронов для их роста;

5. Установить влияние температуры на рост чистых культур СРБ, выделенных из осадков влажных местообитаний Норильской промышленной зоны, и на образование ими сероводорода;

6. Изучить влияние ионов меди и других металлов на рост чистых культур СРБ и их разнообразие;

7. Исследовать возможность использования чистыми культурами СРБ нерастворимых природных фосфатов в качестве субстратов для роста.

Научная новизна работы. В ходе исследований впервые изучено разнообразие СРБ в низкотемпературных экосистемах, загрязненных стоками металлургических предприятий. Пять новых СРБ выделены в чистые культуры. Один из полученных штаммов предположительно принадлежит к новому, ранее неописанному виду рода *Desulfomicrobium*. Два изолята являются новыми представителями малоизученных сульфатредуцирующих клостридий. Впервые изучена кинетика роста СРБ с использованием сахарозы и крахмала. Показана возможность роста чистых культур СРБ с использованием природного фосфорита в качестве источника фосфора. Выявлена стимуляция роста СРБ небольшими концентрациями ионов меди (II).

Практическая значимость. Данные о численности и разнообразии СРБ в осадках влажных местообитаний Норильской промышленной зоны и промышленной зоны на Кольском полуострове могут быть использованы при разработке технологий ремедиации, основанных на стимуляции аборигенного сообщества микроорганизмов, способных к переводу растворенных металлов в нерастворимую форму.

Чистые культуры СРБ, выделенные и охарактеризованные в ходе настоящей работы, обладают свойствами, важными с точки зрения использования в биотехнологиях осаждения металлов, а именно: устойчивостью к металлам, психротолерантностью, ацидотолерантностью, способностью к использованию дешевых органических веществ (этанола, сахаров) и нерастворимых природных фосфоритов в качестве ростовых субстратов. Штаммы могут быть рекомендованы для тестирования в in situ и ex situ технологиях очистки вод от металлов. На основе результатов изучения физиологических свойств культур возможно определение технологических коридоров оптимума для их использования в экобиотехнологиях. В настоящее время чистые культуры, выделенные в ходе данной работы, проходят испытание в биореакторной установке в Институте инженерии окружающей среды и биотехнологии Технологического университета Тампере (Финляндия) в рамках проекта «Biotechnology for metal bearing material in Europe».

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на международных научных конференциях «Экология и рациональное природопользование на рубеже веков. Итоги и перспективы» (Томск, 2000), «Экология Южной Сибири – 2000 год» (Абакан, 2000), «Эколого-экономические проблемы природопользования» (Томск, 2004), конференциях молодых ученых «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий» (Абакан, 2004), «Наука и образование» (Томск, 2005); школе - конференции «III Сибирская школа молодого ученого» (Томск, 2003); XL, XLI, XLIII международных конференциях «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2002, 2003, 2005); на международной конференции по Арктической Микробиологии «International Conference on Arctic Microbiology» (Рованиеми, Финляндия, 2004), на международной конференции по энвайронментальной, индустриальной и прикладной биотехнологии «BioMicroWorld2005» (Бадахос, Испания, 2005), на Российско-французском форуме «Актуальные проблемы экологии и природопользования Сибири в глобальном контексте» (Томск, 2006), а также на 11 Международном Симпозиуме по Экологической микробиологии «ISME-11» (Вена, Австрия, 2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 18 печатных работ, в том числе 2 в журналах, входящих в перечень ВАК.

Структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов и их обсуждения, заключения и выводов, списка использованных источников и литературы. Список использованных источников и литературы включает 256 наименований, 23 из которых на русском языке, а 233 – на иностранных языках. Работа изложена на 152 листах машинописного текста, включает 19 таблиц и 25 рисунков.

Список сокращений: ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; K_i – константа ингибирования; рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота; СРБ – сульфатредуцирующие бактерии; APS – персульфат аммония; DAPI - 4',6-диамидин-2-фенилиндол; DGGE – денатурирующий градиентный гель-электрофорез; FISH – флуоресцентная гибридизация in situ; PBS – фосфатно-солевой буфер; SDS – додецилсульфат натрия; TAE – Трис-ацетат-ЭДТА-буфер; TE – Трис-ЭДТА-буфер; TEMED – тетраметилэтилендиамин.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В данной работе использовали 6 штаммов СРБ: *Desulfovibrio spp. A1, A2, A4* (выделены А.А. Давыдовым из сточных вод Челябинского металлургического комбината); *Desulfovibrio sp. R2* (выделен С.Ю. Курочкиной из стоков объединения «РОЛТОМ» (Курочкина, 2002)); *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 7757 (депонирован в Американской Типовой Коллекции Культур); *Desulfomicrobium sp*.63 (выделен О.В. Карначук из придонных осадков Черного моря). В качестве источников для выделения новых чистых культур в ходе настоящей работы использовали осадки влажных местообитаний, загрязненных стоками металлургических комбинатов ОАО «ГМК «Норильский никель» на полуострове Таймыр (Заполярный филиал) и на Кольском полуострове (АО «Комбинат «Североникель»).

<u>Культивирование СРБ.</u> СРБ выращивали на стандартной пресноводной среде Видделя с соответствующими добавками (Widdel, Bak, 1992). Растворы органических веществ – доноров углерода и электронов также готовили по методу Видделя и Бака (Widdel, Bak, 1992). Культивирование проводили при температуре +28 ºС. При изучении роста СРБ при различных температурах термостат настраивали на +4 ºС, +10 ºС, +12 ºС, +23 ºС, +25 ºС, +35 ºС, +36 ºС. Устойчивость к ионам металлов изучали, используя растворы $K_2Cr_2O_7$, $CdCl_2$x$2.5H_2O$, $CuSO_4$x$5H_2O$, $NiCl_2$, $CoCl_2$x$6H_2O$ различных концентраций. Среду и добавки стерилизовали автоклавированием в течение 30 минут при +121ºС. Растворы витаминов, аминокислот и сахаров стерилизовали фильтрованием (0.2 μм). Для удаления кислорода среду кипятили и быстро охлаждали непосредственно перед посевом. Культивирование проводили во флаконах емкостью 15, 100 и 500 мл. Для поддержания культуры в активном состоянии делали регулярные пересевы.

<u>Эксперименты по определению кинетических параметров роста.</u> Кинетические параметры роста микроорганизмов (истинная удельная скорость роста без учета скорости отмирания (далее «удельная скорость роста») и время удвоения культуры) определяли графоаналитически, используя данные, полученные при измерении концентрации белка в разных временных точках в период фазы экспоненциального роста (Варфоломеев, Гуревич, 1999). При изучении влияния меди (II) на рост чистых культур константу ингибирования (K_i) определяли графоаналитически в координатах Диксона на участке неконкурентного ингибирования. Температурную кинетику определяли графоаналитически на восходящем участке кривой зависимости удельной скорости роста от температуры, где применимо уравнение Аррениуса.

Все ростовые эксперименты, не связанные с определением оптимальных доноров углерода и электронов, проводили на среде с лактатом. При изучении роста СРБ с использованием нерастворимых фосфатов в среду добавляли 0.5 % стерильного природного порошка фосфорита.

Определение численности СРБ. Численность СРБ определяли методом предельных разведений на жидкой пресноводной среде Видделя. Инкубировали в течение полугода при различных условиях рН и температуры: 7.2, +4 ˚С; 7.2, +28 ˚С; 3.5, +4 ˚С; 3.5, +28 ˚С. В качестве доноров углерода и электронов в среду вносили лактат, этанол, глюкозу, ацетат и бензоат. Подсчет СРБ проводили ежедекадно. Численность определяли визуально по обесцвечиванию индикатора восстановленности среды (резазурина Na) и почернению среды вследствие образования сульфида железа. Использовали 3 ряда последовательных разведений. Наиболее вероятное число бактерий в образцах рассчитывали с использованием таблиц Мак-Креди (Koch, 1994).

Аналитические методы. Концентрацию сероводорода определяли спектрофотометрически по методу Пахмаейра (Pachmayr, 1960). Количество белка определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951) с использованием фенольного реактива Фолина. Ацетат определяли методом газовой хроматографии с подкислением щавелевой кислотой. В качестве внутреннего стандарта использовали пропионовую кислоту (Kaksonen et al., 2004). В качестве газа-носителя применяли гелий. Для определения использовали газовый хроматограф «Hewlett Packard 5890 Series II, Corvallis, OR», который был оборудован капиллярной колонкой 25-30 м x 0.32 мм, покрытой слоем полиэтиленгликоля толщиной 0.25 м («HP-INNOWax, Agilent, USA») и детектором ионизации пламени.

Выделение хромосомной ДНК и амплификация гена 16S рРНК. Для выделения хромосомной ДНК микроорганизмов собирали клетки центрифугированием при 5000g в течение 15 минут в конце экспоненциальной фазы и промывали ТЕ-буфером. Клетки лизировали щелочным раствором SDS. Лизат обрабатывали смесью фенола, хлороформа и изоамилового спирта (25:24:1) (рН=8), а затем – смесью хлороформа и изоамилового спирта (24:1). ДНК осаждали при -20ºС 3М ацетатом натрия (1/10 от объема) и этанолом (2.5 объема). Осадок споласкивали 70 % этанолом, подсушивали и растворяли в ТЕ-буфере (рН=8). Для амплификации гена 16S рРНК использовали следующие праймеры: 27F (5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (100 mM, "Oligomer"). Амплификацию проводили в автоматическом амплификаторе «MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler, DNA Engine». После начальной денатурации при 95 ºС (15 минут) следовали 30 циклов: 1 минута при 94 ºС, 2 минуты при 50 ºС, 2 минуты при 72 ºС. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1 % агарозном геле. Коммерческое секвенирование последовательности гена 16S рРНК (~1500bp) осуществлялось в Университете Хельсинки (Финляндия).

Денатурирующий градиентный гель-электрофорез (DGGE). Для амплификации 16S рРНК применяли праймеры: прямой BacV3f (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG -3') и обратный 907R (5'- CCG TCAATTCMTTTGAGTTT -3'). DGGE проводили, используя систему «Dcode System (Biorad laboratories, Hercules, CA, U.S.)». Применяли 8 % полиакриламидный гель с денатурирующими градиентами от 30 % до 65 % (100 % денатурирующий раствор содержит 7 М мочевину и 40 % формамид). Добавляли 10 % APS и TEMED в качестве полимеризующих агентов. Лунки промывали TAE. Электрофорез проводили 16 часов в TAE-буфере при 60 ºС и 100 V. Гель окрашивали бромистым этидием (0.5 мг/л) в TAE-буфере. Фотографировали под УФ лучами (320 нм) с помощью цифровой камеры. Анализ микробного сообщества осуществляли при помощи программы «GelCompar II» (Applied Maths, Gent, Belgium). Для секвенирования отдельные полосы вырезали в УФ лучах, инкубировали 12 часов в 20 мкл стерильной дистиллированной воды при + 4 ºС. Далее проводили ПЦР с теми же праймерами (прямой Bac V3f (без GC-кластеров) и обратный 907R).

Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH). Пробы для проведения FISH-анализа фиксировали 96 % этанолом (1:1) и хранили при +4 ºС. Фиксированные клетки осаждали центрифугированием при 9000 об./мин в течение 2 минут и дважды промывали PBS-буфером (10 мМ Na-фосфат, 130 мМ NaCl, pH=7.2). Клетки ресуспендировали в PBS-буфере и наносили в лунки предметных стекол ("Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co". KG, Braunschweig, Germany"), предварительно покрытых желатином. К дегидратированным клеткам в гибридизационном буфере добавляли род- и группоспецифические олигонуклеотидные зонды "MedProbe Eurogentech", Seraing, Belgium, инкубировали 1.5 часа при +46 ºС в камерах, насыщенных NaCl. Промывали и окрашивали DAPI. Хранили в темноте. Подсчет проводили не менее чем на 10 полях, общее число клеток составляло не менее 1000. Результаты корректировали с вычетом сигналов, наблюдаемых при использовании отрицательного контроля (зонд NON338).

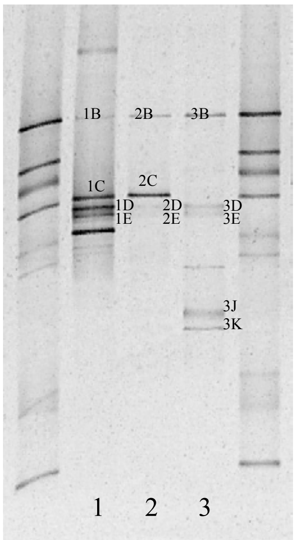
Микроскопирование и микрофотосъемка. Чистые и накопительные культуры СРБ микроскопировали с использованием фазово-контрастного устройства, окуляра х10, объектива «Achroplan 100x/ 1.25 oil Ph3». При обработке результатов FISH микроскопирование проводили с использованием эпифлуоресцентного микроскопа «Axioskop 2 plus», (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Germany). Микрофотосъемку осуществляли при увеличении 1000х, применяя фотосистему «AxioCam MRc Zeiss» и компьютерную программу MR Grab.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Численность и разнообразие СРБ в осадках влажных местообитаний, загрязненных стоками металлургических комбинатов в Норильской промышленной зоне и на Кольском полуострове

Наиболее высокая численность СРБ в осадках Норильской промышленной зоны (Заполярный филиал ОАО «ГМК «Норильский никель» на полуострове Таймыр) обнаружена на среде с глюкозой, этанолом и лактатом; она составила $1.5x10^7$ кл/мл, что сопоставимо с ранее опубликованными результатами исследования численности СРБ в низкотемпературных морских осадках (Knoblauch et al., 1999). В ряде случаев наиболее вероятное число СРБ при +4 ºС и +28 ºС было одного порядка. Максимальная численность СРБ в пробе осадков, загрязненных отходами металлургического предприятия АО «Комбинат «Североникель» на Кольском полуострове (К10), составила $2.5x10^5$ кл/мл, что на два порядка ниже численности СРБ в подобных местообитаниях на полуострове Таймыр. Для идентификации культивируемых СРБ в накопительных культурах использовали метод флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Показано, что *Desulfobulbus* является доминирующей группой СРБ в исследуемых накопительных культурах. Ранее было показано, что *Desulfobulbus* spp. также доминируют в сообществах биопленок в сточных водах и в загрязненных осадках (Ito et al., 2002; Kleikemper et al., 2002). Группа *Desulfosarcina-Desulfococcus* была многочисленной в накопительных культурах с низким pH среды. Использование ДНК-зондов, специфичных для рода показало, что *Desulfococcus spp*. преобладают над *Desulfosarcina* s*pp*. в большинстве накопительных культур.

Влияние ионов меди (II) на состав накопительных культур СРБ, наряду с методом FISH, изучали с использованием денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGGE) (рисунок 1). Методом FISH установлено, что с увеличением концентрации меди от 0.007 мг/л до 200 мг/л возрастало количество и разнообразие СРБ в накопительных культурах, что, вероятно, связано с повышенной устойчивостью бактерий этой группы к меди (II) по сравнению с другими группами микроорганизмов. При повышении концентрации меди (II) до 300 мг/л в культурах K10 методом DGGE обнаружено увеличение содержания представителей *Desulfovibrio spp.*



1B – Ralstonia pickettii (100%)
1C – Acidovorax defluvii (95%)
1D - Agrobacterium tumefaciens (96%)
1E – Desulfosporosinus orientis (97%)

2B – Ralstonia pickettii (100%)
2C - Acidovorax defluvii (95%)
2D – Agrobacterium tumefaciens (96%)
2E – Desulfosporosinus orientis (97%)

3B – Ralstonia pickettii (100%)
3D – Agrobacterium tumefaciens (96%)
3E – Desulfosporosinus orientis (97%)
3J – Desulfovibrio putealis (99%)
3K – Desulfovibrio magneticus (98%)

Рисунок 1 - DGGE-профили бактериального сообщества в накопительных культурах. Слева направо: стандартная смесь; 1 - К10, накопительная культура, выращенная с добавлением меди (II) в качестве микроэлемента (0.007 мг/л); 2 - К10, 200 мг/л меди (II); 3 - К10, 300 мг/л меди (II); стандартная смесь

2. Выделение и изучение сульфатредуцирующих бактерий из экосистем, подверженных влиянию стоков металлургических предприятий

Из осадков влажных местообитаний, загрязненных стоками комбинатов по добыче и переработке руд Заполярного филиала ОАО «ГМК «Норильский никель» на полуострове Таймыр и АО «Комбинат «Североникель» на Кольском полуострове, были получены накопительные культуры. Из накопительных культур были выделены пять чистых культур СРБ (рисунок 2). Филогенетическую принадлежность выделенных микроорганизмов определяли путем сравнительного анализа последовательностей гена 16S рРНК, близких к полным (около 1500 пар оснований).

Из осадков Норильской промышленной зоны на полуострове Таймыр и из осадков, загрязненных стоками металлургического комбината на Кольском полуострове были выделены 2 чистые культуры СРБ, принадлежащих к роду *Desulfosporosinus – Desulfosporosinus. sp. OT2* и *Desulfosporosinus sp. MS* (рисунок 3). Последний был выделен на ацетате при pH=3.5.

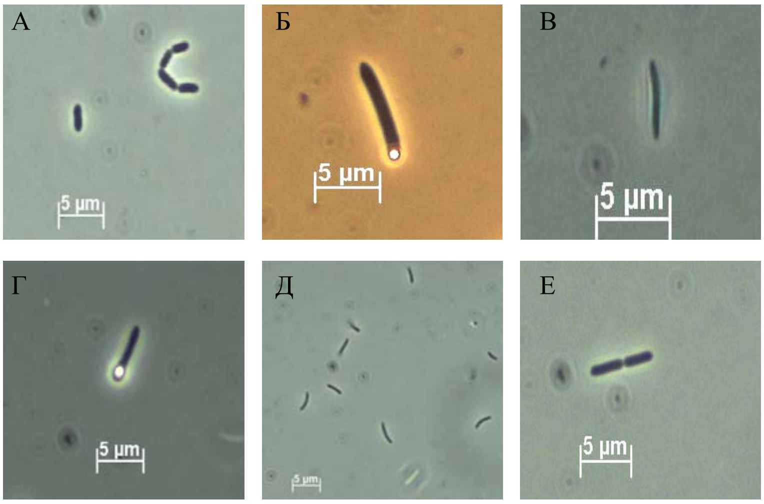


Рисунок 2 – Микрофотографии *Desulfomicrobium sp. BL* (А), *Desulfosporosinus sp. OT2* (Б), *Desulfosporosinus sp. MS* (В) *Clostridium sp. KA* (Г, Д), *Clostridium sp. RL* (Е). Фазово-контрастная микроскопия, x1000

Описанные на сегодняшний день представители этого рода - *D. orientis* (Stackebrandt et. al., 1997), *D. meridie* (Robertson et al., 2001), *D. auripigmenti* (Stackebrandt et. al., 2003) - не проявляли способности к использованию ацетата в качестве донора электронов и углерода. В настоящее время к ацетат-окисляющим СРБ исследователи проявляют особый интерес в связи с их перспективностью для использования в биореакторах в составе консорциумов, традиционно представленных сульфатредукторами с неполным окислением (Puhakka et al., unpublished). Из осадков Кольского полуострова были выделены еще два спорообразующих изолята. СРБ штаммов RL и KA наиболее близкородственны представителям рода *Clostridium* (рисунок 3). Интересно отметить, что ранее уже была выделена сульфатредуцирующая бактерия этого рода - *Clostridium sulfatireducens*, которая до настоящего времени полностью не описана (Alvarez et al., unpublished). Последовательность 16S рДНК бактерий штамма RL демонстрирует сходство с последовательностью *Clostridium sulfatireducens*.

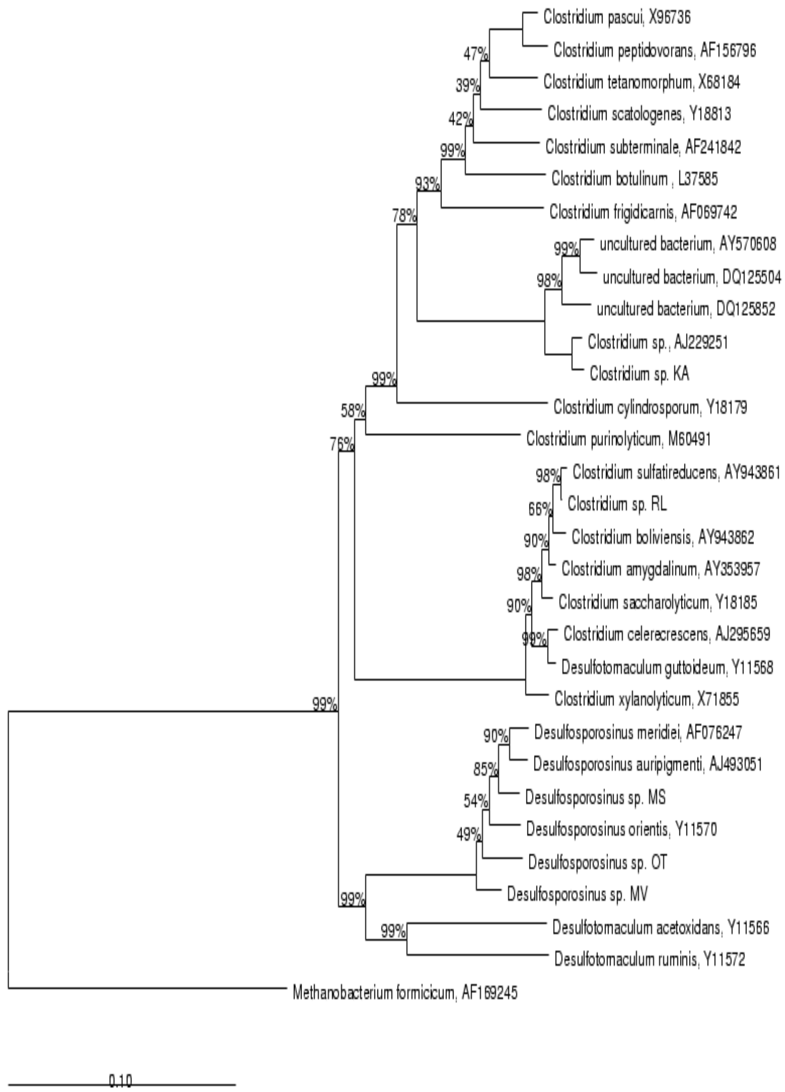


Рисунок 3 - Дендрограмма, отражающая филогенетическое положение чистых культур СРБ штаммов OT2, KA, RL, MS, выделенных из низкотемпературных осадков промышленной зоны в Норильске и на Кольском полуострове. Масштаб соответствует 10 заменам на каждые 100 нуклеотидов

Обилие спорообразующих форм СРБ в осадках, загрязненных стоками металлургических предприятий, объясняется их повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам, в частности, к низкому pH среды. Так, *Desulfosporosinus sp. OT2* обладает способностью к росту и осаждению меди в условиях начального низкого pH (нижняя граница 1.5).

Неспорообразующий микроорганизм, выделенный из осадков Норильской промышленной зоны, обозначенный как *Desulfomicrobium sp. BL* (рисунок 4), утилизирует органические кислоты, аминокислоты, спирты, фруктозу. В отношении использования различных соединений в качестве доноров и акцепторов электронов наиболее близким к *Desulfomicrobium sp. BL* является ранее описанный *D. apsheronum* (Розанова с соавт., 1988). Отличия в наборе используемых субстратов проявляются в возможности роста *Desulfomicrobium sp. BL* на среде с цитратом, сукцинатом и фруктозой, тогда как *D. apsheronum* данные органические вещества не использует.

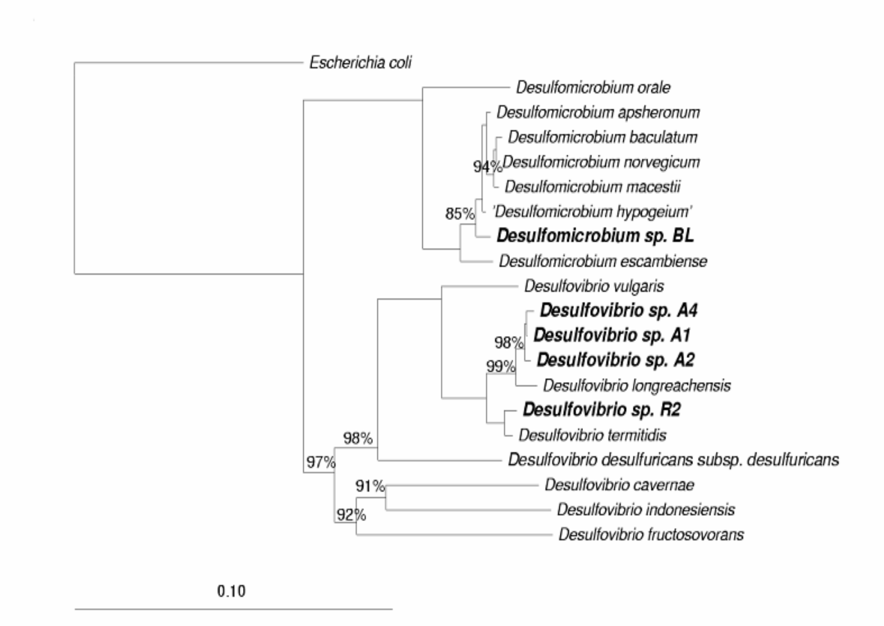


Рисунок 4 - Дендрограмма, отражающая филогенетическое положение чистых культур СРБ, выделенных из экосистем, загрязненных отходами металлургических комбинатов (*Desulfovibrio spp. A1, A2, A4, R2* и *Desulfomicrobium sp. BL).* Масштаб соответствует 10 заменам на каждые 100 нуклеотидов

И *D. apsheronum*, и исследуемый микроорганизм, способны расти на среде с сульфатом, тиосульфатом, фумаратом в качестве акцептора электронов и не используют нитрат. Однако установлена способность *Desulfomicrobium sp. BL* к росту на среде с элементной серой.

В работе также использованы чистые культуры СРБ, выделенные ранее из сточных вод Челябинского металлургического комбината. Культуры представлены подвижными вибрионами и определены как принадлежащие к роду *Desulfovibrio* (рисунок 4). Филогенетически штаммы наиболее близки к *Desulfovibrio longreachii* (Redburn, Patel, 1994) с 98 % гомологией.

3. Изучение физиологических свойств чистых культур СРБ

Определение оптимальных органических субстратов – доноров углерода и электронов для роста СРБ рода *Desulfovibrio,* выделенных из сточных вод Челябинского металлургического комбината. *Desulfovibrio spp. A1, A2, A4,* выделенные из сточных вод Челябинского металлургического комбината, утилизируют широкий круг органических субстратов, включая органические кислоты, спирты, аминокислоты, ароматические соединения моно- и дисахара с неполным окислением. Обнаружены также признаки роста на среде с растворимым крахмалом. Моно- и дисахара являются экономически выгодными субстратами для использования в биотехнологии. Однако оптимальными субстратами для роста *Desulfovibrio sp. A4* являются этанол и лактат. Наиболее высокая удельная скорость роста и наименьшее время удвоения для чистой культуры *Desulfovibrio sp. A4* отмечены при внесении лактата в качестве донора электронов и углерода (таблица 1).

Таблица 1 - Кинетические параметры роста *Desulfovibrio sp. A4* на средах с различными органическими субстратами – донорами электронов и углерода

Источник углерода и электронов	Удельная скорость роста (μ), час$^{-1}$	Время удвоения (Т), час
Этанол	0.052 ± 0.006	13.52 ± 1.52
Лактат	0.239 ± 0.03	2.94 ± 0.39
Глюкоза	0.084 ± 0.03	9.71± 4.99
Сахароза	0.054 ± 0.009	13.1 ± 2.53
Крахмал	0.037 ± 0.01	20.37 ± 6.72

При росте с добавлением моносахарида глюкозы и дисахарида сахарозы удельные скорости роста были одного порядка с отмеченными в литературе, например, для *Desulfovibrio fructosovorans*, растущего на фруктозе (0.06 $ч^{-1}$) (Ollivier et al., 1988). Наибольшая продукция белка и сероводорода наблюдалась при росте на среде с этанолом (до 873.5 мг/л и 158.8 мг/л соответственно). Наименьшая продукция сероводорода и белка наблюдалась при культивировании *Desulfovibrio sp. A4* на среде с крахмалом (до 14.7 мг/л и 3.2 мг/л соответственно).

Влияние ионов меди и других металлов на рост чистых культур СРБ. Знания о предельных концентрациях металлов, при которых возможен рост, необходимы в связи с использованием СРБ в биотехнологиях очистки (Utgikar et al., 2001). Так, *Desulfomicrobium sp. BL, Clostridium sp. KA* и *Desulfosporosinus sp. OT2* из низкотемпературных осадков, подверженных загрязнению стоками металлургических комбинатов в Норильске и на Кольском полуострове, толерантны к меди (II) в концентрациях до 450, 550 и 2000 мг/л соответственно. *Desulfovbirio spp. A1, A2, A4,* выделенные из сточных вод Челябинского металлургического комбината, обладают устойчивостью к меди (II) в концентрации до 600, 2600 и 325 мг/л соответственно. Штаммы *Desulfovibrio* проявляют также резистентность к никелю (II), кобальту (II), кадмию (II) и хрому (IV).

Обнаружена стимуляция роста *Desulfovibrio sp. A2* на среде с медью (II) в небольших концентрациях (рисунок 5, таблица 2). Медь (II) необходима СРБ как микроэлемент, играющий роль кофактора для металлопротеинов и определенных ферментов в концентрации не больше 0.007 мг/л (Widdel, Bak, 1992; Gadd, 1992). В ходе многочисленных исследований показано, что даже такие небольшие количества меди (II) как 0.38 мг/л (Sani et al., 2001) и 0.007 мг/л (Курочкина, 2002) могут ингибировать рост представителей *Desulfovibrio*. В настоящем исследовании наблюдалось увеличение скорости роста *Desulfovibrio sp. A2* в присутствии 0.007 мг/л меди (II) и усиление продукции сероводорода, что свидетельствует в пользу более интенсивной сульфатредукции. В ходе дальнейшего повышения концентрации меди в среде происходил спад продукции белка бактериями изучаемого штамма.

Принимая во внимание вышеизложенные факты, логично предположить, что стимуляция роста в присутствии 10 мг/л и 20 мг/л меди (II) не связана с использованием ионов данного металла в качестве субстрата для роста. Стимуляция метаболизма микроорганизмов невысокими концентрациями токсических веществ может объясняться эффектом Арндт-Шульца (Громов, Павленко, 1989). Данный эффект заключается в том, что аккумуляция яда в нелетальных концентрациях на поверхности клетки изменяет проницаемость мембраны, нарушает ее барьерные свойства, что определяет свободное поступление пищи в клетку и, соответственно, усиление метаболизма.

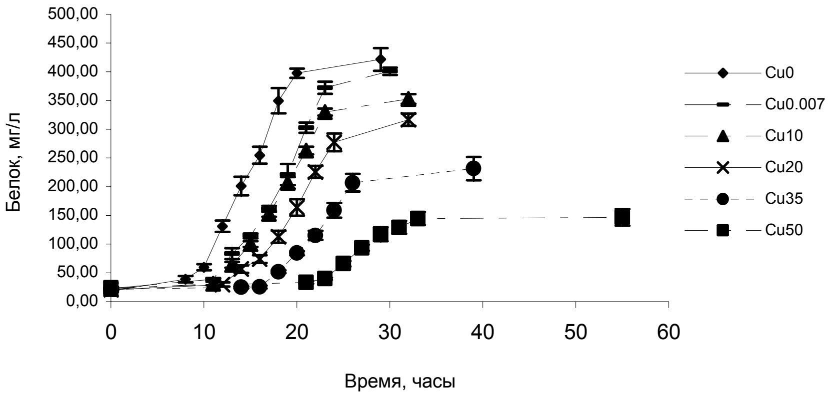


Рисунок 5 - Рост *Desulfovibrio sp. A2* в присутствии ионов меди (II) в различных концентрациях

Таблица 2 – Кинетические параметры роста *Desulfovibrio sp. A2* в присутствии различных концентраций ионов меди

Концентрация меди (II), мг/л	Удельная скорость роста (μ), час$^{-1}$	Время удвоения (T), час	Продолжитель-ность lag-фазы, час
0.0	0.19 ± 0.01	3.63 ± 0.18	8.0
0.007	0.203 ± 0.01	3.42 ± 0.22	11.0
10.0	0.215 ± 0.009	3.22 ± 0.14	11.0
20.0	0.232 ± 0.02	3.01 ± 0.27	12.0
35.0	0.233 ± 0.01	2.99 ± 0.14	16.0
50.0	0.166 ± 0.04	4.39 ± 1.2	23.0

Как известно, ингибирование роста микроорганизмов тяжелыми металлами происходит по типу неконкурентного ингибирования. Так, наблюдали ингибирующий эффект меди (II) при концентрациях 35-50 мг/л, где Ki составила 57 мг/л. Однако микроорганизм способен расти при содержании меди до 2600 мг/л. Вероятно, в присутствии меди в концентрации выше ингибирующей включаются генетически кодируемые механизмы устойчивости. Наличие генетических детерминант устойчивости к меди ранее было показано для некоторых почвенных бактерий (Trajanovska et al., 1997), энтеробактерий (Williams et al., 1993) и для сульфатредуцирующих бактерий (Karnachuk et al., 2003).

Влияние температуры на рост *Desulfomicrobium sp. BL*. Чистые культуры СРБ, *Desulfosporosinus sp. OT2* и *Desulfomicrobium sp. BL*, выделенные из низкотемпературных осадков Норильской промышленной зоны, демонстрируют психротрофные свойства. *Desulfomicrobium sp.BL* проявляет способность к активному росту и продукции сероводорода при низких положительных температурах. Нижний температурный предел для роста менее +4 ºC, верхний - +35 ºC, при +36 ºC рост отсутствовал. Максимальная скорость роста *Desulfomicrobium sp.BL* отмечена при температуре +25 ºC (рисунок 6). Наибольшая продукция биомассы - до 610.7 мг/л белка - наблюдалась при температуре +23 ºC, что ниже оптимальной с точки зрения скорости роста. Таким образом, температурный оптимум для роста данного микроорганизма составляет +23 ºC - +25 ºC. Зависимость удельной скорости роста от температуры на восходящем участке кривой (рисунок 6) описывается следующим уравнением: $\ln\mu = -10.21x10^3 \cdot 1/T$, где μ - удельная скорость роста, а T – абсолютная температура в градусах Кельвина.

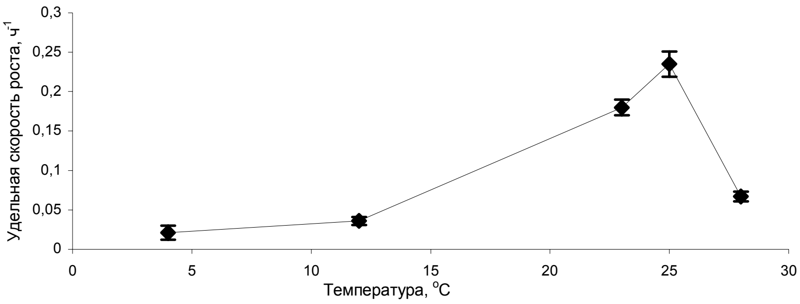


Рисунок 6 - Кривая зависимости удельной скорости роста *Desulfomicrobium sp.BL* от температуры

Использование нерастворимых природных фосфатов в качестве субстратов для роста чистых культур СРБ. С точки зрения возможного применения СРБ в биотехнологиях очистки от тяжелых металлов полезным свойством может оказаться использование в качестве субстратов роста малорастворимых природных соединений. Ранее было показано, что чистые культуры СРБ способны использовать фосфор, содержащийся в нерастворимых соединениях, в процессе метаболизма, а также могут принимать участие в анаэробной мобилизации ортофосфата в природных экосистемах, причем механизмы, лежащие в основе этого явления, могут быть различными (Карначук, 1995). Для изучения роста СРБ на средах с добавлением природного фосфорита в качестве единственного источника фосфора был проведен ряд экспериментов с чистыми культурами *Desulfovibrio sp. R2, Desulfovibrio sp. A1, Desulfovibrio desulfuricans ATCC 7757, Desulfomicrobium sp. 63*. Выяснили, что наиболее активный рост в присутствии нерастворимого источника фосфора демонстрирует *Desulfomicrobium sp. 63* (таблица 3). Бактерии рода *Desulfovibrio* обнаруживали менее высокую скорость роста на среде с внесением фосфорита, однако для *Desulfovibrio sp. A1* отмечена максимальная продукция биомассы и сероводорода. Необходимо отметить, что свойством расти в присутствии нерастворимых источников фосфора обладают СРБ, выделенные как из промышленных экосистем (*Desulfovibrio spp. A2, R2*), так и из экологически чистых местообитаний (*Desulfomicrobium sp. 63, Desulfovibrio desulfuricans ATCC 7757*).

Таблица 3 – Кинетические параметры *роста Desulfovibrio sp. R2, Desulfovibrio desulfuricans, Desulfomicrobium sp. 63* и *Desulfovibrio sp. A2* с использованием нерастворимого источника фосфора

Параметры роста / Штамм	Удельная скорость роста (μ), час $^{-1}$	Время удвоения (T), час
Desulfovibrio sp.R2	0.095 ± 0.02	7.49 ± 1.36
Desulfovibrio desulfuricans ATCC 7757	0.24 ± 0.03	2.91 ± 0.39
Desulfomicrobium sp.63	0.57 ± 0.1	1.24 ± 0.22
Desulfovibrio sp.A2	0.068 ± 0.003	10.15 ± 0.48

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, чистые культуры сульфатредуцирующих бактерий, выделенные из осадков влажных местообитаний, загрязненных стоками металлургических предприятий на полуострове Таймыр и на Кольском полуострове, а также из сточных вод Челябинского металлургического комбината, обладают устойчивостью к ионам меди (II) и других металлов; спорообразующие формы толерантны к повышенной кислотности среды. Изученные СРБ способны к росту с различными органическими субстратами, включая этанол и сахара, а также с использованием нерастворимых источников фосфора, в частности, природного фосфорита.

Данные, полученные в ходе настоящей работы, важны для пополнения знаний о распространении и активности сульфатредуцирующих бактерий в загрязненных экосистемах. Чистые культуры, выделенные из низкотемпературных осадков Норильской промышленной зоны и промышленной зоны на Кольском полуострове, перспективны для использования в биотехнологиях очистки вод от сульфатов и металлов, в том числе в условиях умеренного и бореального климата.

ВЫВОДЫ

1. Численность СРБ в осадках Норильской промышленной зоны и Кольского полуострова достигает $1.5x10^7$ и $2.5x10^5$ клеток на миллилитр влажного осадка, соответственно. Факторы, влияющие на активность сульфатредукторов, различаются в зависимости от сайта и могут включать наличие доноров электрона, температуру и кислотность среды.

2. Преобладающими группами культивируемых СРБ в осадках Норильской промышленной зоны являются *Desulfobulbus spp.* и *Desulfosarcina-Desulfococcus*. В осадках Кольского полуострова обнаружены преимущественно *Desulfarculus-Desulfomonile*, *Desulfobulbus spp.*, *Desulfomicrobium spp*. и *Desulfovibrio spp.*

3. Из низкотемпературных осадков, загрязненных стоками металлургических комбинатов в Норильске и на Кольском полуострове, выделены в чистые культуры спорообразующие ацидотолерантные СРБ *Desulfosporosinus spp. OT2, RLAc* и *Clostridium spp. KA, RL* и неспорообразующий *Desulfomicrobium sp.BL*.

4. *Desulfovibrio spp. A1, A2, A4*, выделенные из сточных вод Челябинского металлургического комбината, утилизируют различные органические субстраты с неполным окислением. Наиболее предпочтительными субстратами для их роста служат лактат и этанол. Обнаружена способность к росту на среде с сахарами.

5. *Desulfomicrobium sp. BL* и *Desulfosporosinus sp. OT2*, выделенные из осадков Норильской промышленной зоны, проявляют психротолерантные свойства. *Desulfomicrobium sp. BL* способен к активному росту и продукции сероводорода при низких положительных температурах. Определена температурная кинетика. Оптимум для роста *Desulfomicrobium sp. BL* +23 ºC - +25 ºC.

6. Сульфатредуцирующие бактерии, выделенные из загрязненных местообитаний, устойчивы к меди (II) и другим тяжелым металлам.

Обнаружен эффект стимуляции роста *Desulfovbirio sp. A2* ионами меди (II) в небольших концентрациях. Ki составила 57 мг меди (II) на литр. Отмечено возрастание разнообразия СРБ в накопительных культурах с увеличением концентрации меди (II) в среде, что, вероятно, связано с повышенной устойчивостью бактерий этой группы по сравнению с другими группами микроорганизмов. Представители *Desulfovibrio* наиболее устойчивы к ионам меди (II) среди сульфатредукторов.

7. Сульфатредуцирующие бактерии способны к активному росту при внесении природного фосфорита как единственного источника фосфора. Свойством расти в присутствии нерастворимых фосфатов обладают сульфатредукторы, выделенные как из промышленных экосистем, так и из экологически чистых местообитаний.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Карначук О.В., Франк Ю.А. Сапрофитные микроорганизмы подземных и поверхностных вод республики Хакасия // Экология и рациональное природопользование на рубеже веков. Итоги и перспективы: Материалы международной конференции. - Томск: изд-во ТГУ, 2000. – Т. II. – С. 54-55.
2. Курочкина С.Ю., Ванина Ю.Н., Ивасенко Д.А., Франк Ю.А. Бактериальная сульфатредукция в водной толще озера Шира // Экология Южной Сибири – 2000 год: Материалы Южно-Сибирской международной научной конференции. - Абакан: изд-во ХГУ, 2000. – С. 177-179.
3. Франк Ю.А. Численность сапрофитных микроорганизмов в воде озера Шира // Материалы V региональной конференции «III Сибирская школа молодого ученого». – Томск: изд-во ТГПУ, 2001. – Т.1. – С. 131-134.
4. Казаченок А.А., Франк Ю.А., Казаков Д.В. Численность сульфатредуцирующих бактерий в озере Шира // Материалы XL международной конференции молодых ученых «Студент и научно-технический прогресс»: Биология. – Новосибирск: изд-во НГУ, 2002 – С. 22-23
5. Казаченок А.А., Франк Ю.А. Изучение устойчивости сульфатредуцирующих бактерий к низким температурам и тяжелым металлам // Материалы XLI международной конференции молодых ученых «Студент и научно-технический прогресс». – Новосибирск: изд-во НГУ, 2003. – С. 114-115.
6. Франк Ю.А. Влияние ионов шестивалентного хрома на гидрогеназную активность в бесклеточном экстракте *Desulfobacterium sp.63//* Материалы XLI международной конференции молодых ученых «Студент и научно-технический прогресс». – Новосибирск: изд-во НГУ, 2003. – С. 85-86.

7. Гончарова А.И., Франк Ю.А. Выделение чистых культур сульфатредуцирующих бактерий из накопительных культур // Эколого-экономические проблемы природопользования: Материалы юбилейной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. – Томск: Дельтаплан, 2004. – С. 3-7.
8. Герасимчук А.Л., Франк Ю.А. Выделение и изучение чистой культуры сульфатредуцирующих бактерий, устойчивых к тяжелым металлам и пониженным температурам, из осадков ветландов Норильской промышленной зоны // Экология Южной Сибири и сопредельных территорий: Материалы международной научной конференции. - Абакан, 2004. – С. 9.
9. Франк Ю.А., Герасимчук А.Л. Психротолерантные сульфатредуцирующие бактерии, перспективные для биотехнологии // Материалы XLIII международной конференции молодых ученых «Студент и научно-технический прогресс»: Биология. – Новосибирск: изд-во НГУ, 2005. – С. 180-181.
10. Франк Ю.А., Маслянко М.А., Герасимчук А.Л., Суханова О.С. Доноры углерода и электрона для роста новых сульфатредуцирующих бактерий родов *Desulfovibrio, Desulfomicrobium* и *Desulfosporosinus* // Материалы IX Всероссийской конференции молодых ученых «Наука и образование».- Томск: изд-во ТГПУ, 2005. - Т.1, часть 2. – С. 98-102.
11. Карначук О.В., Пименов Н.В., Юсупов С.К., Франк Ю.А., Пухакка Я.А., Иванов М.В. Распределение, разнообразие и активность сульфатредуцирующих бактерий в водной толще озера Гек-Гель, Азербайджан // Микробиология. - 2006. – Т. 75, № 1. – С. 1-9.
12. Герасимчук А.Л., Франк Ю.А., Щучкин А.М. Сульфатредуцирующие ацидотолерантные бактерии из осадков Норильской промышленной зоны // Материалы X международной экологической студенческой конференции «Экология России и сопредельных территорий. Экологический катализ». - Новосибирск: изд-во НГУ, 2005. – С. 100.
13. Франк Ю.А., Герасимчук А.Л. Биоразнообразие сульфатредуцирующих бактерий в осадках Норильской промышленной зоны // Сборник докладов 1-ой международной научно-практической конференции «Студент и научно-технический прогресс: лидеры нового поколения». - Усть-Каменогорск, Казахстан, 2006. – С. 68-71.
14. Франк Ю.А., Лушников С.В. Биотехнологический потенциал сульфатредуцирующих бактерий // Экология и промышленность Росси. - 2006. - № 1. – С. 10-13.
15. Karnachuk O.V., Kurochkina S.Y., Nicomrat D., Frank Y.A., Ivasenko D.A., Phyllipenko E.A., Tuovinen O.H. Copper resistance in *Desulfovibrio strain R2 //* Antonie Van Leuwenhoek. Journal of Microbiology. - Holland, 2003. - № 83. – P. 99-106.

16. Karnachuk O.V., Puhakka J.A., Yusupov S.K., Frank Y.A., Kaksonen A., Pimenov N.V., Ivanov M.V., Linstrom E.B. and Tuovinen O.H. Bacterial sulfate-reduction in Russian Arctic sediments impacted by the mining industry // International Conference on Arctic Microbiology (22-25.3.2004, Rovaniemi). – Finland, 2004. – P. 29.
17. Karnachuk O.V., Frank Y.A., Kaksonen A.H., Puhakka J.A., Sasaki K. and Tuovinen O.H. Isolation and characterization of new copper-resistant sulfate-reducing bacteria // International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology "BioMicroWorld" Abstracts (Badajoz, March 15-18). – Spain, 2005. – P. 699.
18. Karnachuk O.V., Pimenov N.V., Yusupov S.K., Frank Y.A., Kaksonen A.H., Puhakka J.A., Lidstrom E.B. and Tuovinen O.H. Sulfate reducing potential in sediments in the Norilsk mining area, Northern Siberia // Geomicrobiology. - 2005. – Vol. 22. – P. 1-9.

Автор выражает благодарность научному руководителю к.б.н., с.н.с. О.В. Карначук и сотрудникам кафедры физиологии растений и биотехнологии Томского государственного университета за неоценимую помощь при проведении исследований и написании диссертации. Также – глубокую признательность к.т.н., профессору Г.Л. Генцлеру и д.б.н., профессору Е.В. Евдокимову за обсуждение диссертации и коллегам, оказавшим содействие при выполнении исследований по теме диссертации. Автор также выражает благодарность за помощь при проведении исследований в Институте инженерии окружающей среды и биотехнологии при Технологическом университете Тампере (Финляндия) старшему исследователю Анне Каксонен, и профессору Яаакко Пухакке.

Работа частично выполнена при финансовой поддержке фонда ИНТАС (гранты «Acidophilic and psychrophilic sulfate-reducing bacteria in boreal, acid mine drenage-impacted environments» (INTAS – 2001 – 0731) и «Microbial processes of carbon and sulfur cycling at the oxic-anoxic interface in meromictic lakes» (INTAS – 2001 – 2333)). Молекулярно-генетические исследования осуществлялись при поддержке фонда Правительства Финляндии CIMO и объединенного исследовательского проекта Европейской комиссии «Biotechnology for metal bearing material in Europe» (BioMinE 500329). Изучение некоторых аспектов устойчивости сульфатредуцирующих бактерий к меди финансировалось Федеральным агентством по образованию России (Грант А04-2.12-725).