

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ**

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК**

**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РАН**

*Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского*

*Институт биоинженерии*

*Институт биохимии им. А. Н. Баха*

**РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**МОО «МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО»**

## **ТЕЗИСЫ**

**X МОЛОДЕЖНОЙ ШКОЛЫ–КОНФЕРЕНЦИИ  
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ  
«АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СОВРЕМЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ»**

**27 — 30 ОКТЯБРЯ 2015 г.**



ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
**БИОТЕХНОЛОГИИ**  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

## ВЫДЕЛЕНИЕ АЦИДОТОЛЕРАНТНЫХ *DESULFOVIBRIO* С ПОМОЩЬЮ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В БИОРЕАКТОРЕ

**Д. В. Анциферов, Т. С. Федорова, Е. А. Латыголец, А. Л. Герасимчук, А. А. Ковалева,  
Д. А. Ивасенко, О. В. Карначук**

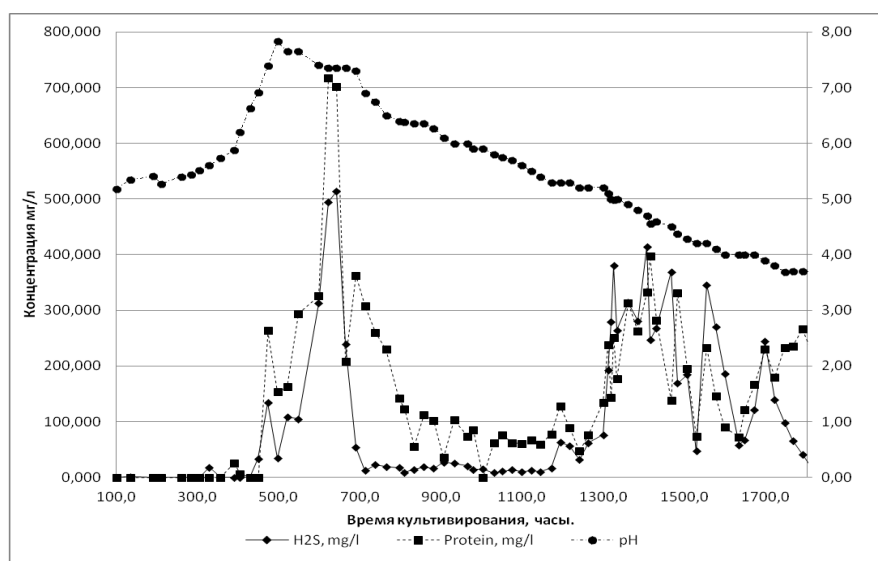
Национальный исследовательский Томский государственный университет  
Кафедра физиологии растений и биотехнологии, Томск, Россия

Хотя сообщения о микробном восстановлении сульфатов в условиях низких pH известны из литературы давно (обзор см. Koschorreck, 2008), до сих пор выделены в чистую культуру единичные представители ацидофильных/ацидотолерантных сульфатредуцирующих бактерий (СРБ). Большинство из них относится к спорообразующим *Desulfosporosinus*. СРБ, способные образовывать сульфиды в условиях низких pH, важны для создания биотехнологических схем по очистке кислых шахтных дренажных вод. С точки зрения создания биотехнологических процессов, ацидофильные *Desulfosporosinus* имеют ряд недостатков, основным из которых является медленный и нестабильный рост. В этом отношении представители *Deltaproteobacteria* имеют преимущество по сравнению с грамположительными СРБ. Недавно был описан первый ацидотолерантный *Desulfovibrio* sp. TomC (Karnachuk et al., 2015). Выращивание СРБ в биореакторе может давать преимущества при выделении чистых изолятов, так как позволяет добиваться доминирования различных форм путем контролируемого изменения условий культивирования. Целью настоящего исследования была попытка выделить чистые культуры ацидофильных/ацидотолерантных СРБ с помощью культивирования в биореакторе.

Первоначальная накопительная культура СРБ была получена в результате посева пробы ШГ-5 микробного обрастания из заброшенной штольни на Северо-Акатуевском месторождении по добыче цинковой руды (п. Новый Акатуй, Александрово-Заводской район, Забайкальский край). Температура воды в месте отбора пробы составляла 2,8 °С, pH 7,15 и Eh = + 271 mV. Анализ методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS) показал, что, несмотря на нейтральный pH, в воде присутствовали высокие концентрации таких металлов, как Fe (1044 мг/л), Cu (263 мг/л), Zn (1713 мг/л), Cd (32,3 мг/л), Pb (5,42 мг/л), U (2,57 мг/л), а также As (91,4 мг/л).

Для получения первоначальной накопительной культуры из пробы ШГ-5 использовали пресноводную среду Видделя с добавлением лактата в качестве донора электронов. Начальный pH составлял 5,04. Накопительную культуру с признаками

сульфатредукции (образование сероводорода) использовали в качестве инокулята для биореактора объемом 2 л (Sartorius Biostat Bplus). Культивирование в биореакторе проводили в режиме периодической культуры на среде Видделя с лактатом. Для создания анаэробных условий биореактор продували газообразным азотом марки о.с.ч. При активном росте культуры продувка азотом позволяла также поддерживать концентрацию  $H_2S$  в газовой фазе на уровне, нетоксичном для клеток накопительной культуры. Культивирование проводили при температуре 28 °С. В качестве лимитирующего (селективного) фактора использовали рН среды. В процессе культивирования производили регулярный отбор проб из биореактора для микроскопического контроля, измерения концентрации  $H_2S$  (Cline, 1969), и белка по методу Лоури. Для контроля смены фило типов в культуре одновременно отбирали пробы для выделения тотальной ДНК и выделения доминирующих форм методом предельных разведений. ДНК выделяли с использованием набора PowerSoil DNA Kit (MoBio). Определение доминирующих фило типов проводили методом амплификации фрагментов гена 16S рРНК и дальнейшим их разделением путем гель-электрофореза в денатурирующих условиях (PCR-DGGE), как описано нами ранее (Frank et al., 2015). Аналогично, для определения филогенетического положения чистых культур, выделенных методом предельного разведения из биореактора, амплифицировали ген 16S рРНК с праймерами 27F и 1492R (DeLong, 1992; Weisburg et al., 1991) по описанным ранее протоколам (Карначук и др., 2009). Секвенирование проводили коммерчески в Центре «Биоинженерия» РАН.



**Рисунок 1.** Изменение концентрации сероводорода, белка и уровня рН со временем при культивировании накопительной культуры ШГ-5 в периодической культуре в биореакторе.

В отличие от серуоокисляющих ацидофилов, образующих  $H^+$ , СРБ в процессе диссимиляционной сульфатредукции потребляют протоны. Поэтому в отсутствие контроля в периодической культуре происходит повышение уровня рН. В условиях

нашего биореактора прироста биомассы не наблюдали до повышения рН до 7,39 (Рис. 1). Одновременно концентрация  $H_2S$  увеличивалась до 133 мг/л. После 498 часов культивирования биомасса (717,8 мг/л), концентрация  $H_2S$  (513,5 мг/л) и рН (7.83) достигли максимума. Начиная с этой точки, рН в биореакторе последовательно снижали. Снижение уровня рН приводило к преобладанию различных морфотипов на разных стадиях культивирования.

Из пробы, отобранной из биореактора через 212 часов после начала культивирования, методом предельных разведений был выделен штамм, обозначенный VK, и из точки 357 ч — штамм ED. Анализ близких к полным последовательностей гена 16S рРНК показал, что штамм VK относится к роду *Desulfovibrio* и его ближайшим родственником является *D. carbinoliphilus*, сходство последовательностей с которым составляло 99 % . Штамм ED также относится к роду *Desulfovibrio* с ближайшим родственником *D. idahonensis* (99 % сходства последовательностей). На момент взятия проб 212 часов и 357 часов рН культуральной жидкости в биореакторе составлял 5,27 и 5.73, соответственно. Дальнейшие исследования показали, что оба новых штамма относятся к ацидотолерантным формам и могут расти при минимальном рН = 3.39 (*Desulfovibrio* sp. VK) и рН = 4.09 (*Desulfovibrio* sp. ED). PCR-DGGE анализ показал присутствие в биореакторе других организмов: *Acinetobacter pittii* (100 %), *Acinetobacter calcoaceticus* (99-100 %), *Terrabacter terrae* (96-97 %), *Sulfurospirillum multivorans* (100 %), *Cupriavidus basilensis* (100 %), *Cellulomonas persica* (99 %), *Desulfovibrio aerotolerans* (99-100 %), *Desulfovibrio mexicanus* (98-99 %).

Таким образом, наше исследование показало, что культивирование накопительных культур микроорганизмов в биореакторе позволяет создавать селективные условия для преимущественного развития целевой группы и ее дальнейшего выделения в чистую культуру.

Исследование было поддержано грантом ФЦП, соглашение № 14.575.21.0067 от 07.08.2014 г. Уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI57514X0067.