

Национальный исследовательский
Томский государственный университет
Биологический институт
Кафедра физиологии растений и биотехнологии
МОО «Микробиологическое общество»
Общество физиологов растений России

**БИОТЕХНОЛОГИЯ, БИОИНФОРМАТИКА И ГЕНОМИКА
РАСТЕНИЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Материалы Всероссийской молодежной
научной конференции с международным участием
26–28 апреля 2016 года**

*Под редакцией
профессора О.В. Карначук*

Томск
Издательский Дом Томского государственного университета
2016

involutus is mineral-specific and controls calcium weathering from minerals [Electronic resource] // Scientific Reports. 2015. The electronic version of the printing publication. URL: <http://doi.org/10.1038/srep12187>.

4. *Tripathi P., Srivastava S.* Mechanism to combat cobalt toxicity in cobalt resistant mutants of *Aspergillus nidulans* // Indian J. Microbiol. 2007. Vol. 47 (47). P. 336–344.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БИНАРНОЙ КУЛЬТУРЫ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В БИОРЕАКТОРЕ*

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

Национальный исследовательский Томский
государственный университет, Томск, Россия

Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) – филогенетически разнородная группа анаэробных микроорганизмов, которые используют сульфат качестве терминального акцептора электронов (Muzyer, Stams, 2008). Многие СРБ обнаружены в местах обитания с экстремальными значениями рН, таких как кислые шахтные дренажи, где рН может иметь значение 2 и ниже (Johnson et al., 1993; Moreau et al., 2010). СРБ представляют большой интерес для технологий биоремедиации (Nordstrom, 2000) благодаря своей способности образовывать высокорекреационный сероводород, который, связываясь с ионами металлов, образует нерастворимые сульфиды (Koschorreck, 2008). В исследованиях последних лет отмечается, что одним из важных компонентов микробных сообществ, которые формируются в экосистемах, связанных с добычей металлов, и характеризуются низкими значениями рН, являются спорообразующие СРБ, принадлежащие к роду *Desulfosporosinus* (Peiffer et al., 2009). Однако, несмотря на объективные доказательства их присутствия, кислотолюбивые

* Работа выполнена при поддержке Минобрнауки (соглашение № 14.575.21.0067 от 07.08.2014 г. Уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI57514X0067).

Desulfosporosinus трудно выделить и культивировать в лабораторных условиях (Lee et al., 2009). Для промышленных технологий большое значение имеет культивирование в биореакторе. Все наши предварительные попытки культивировать *Desulfosporosinus* spp. в лабораторном биореакторе с перемешиванием оканчивались неудачей.

Целью данного исследования были создание бинарной культуры *Desulfosporosinus* с дельта-протеобактериальным *Desulfovibrio* и разработка методики культивирования в лабораторном биореакторе. В качестве объектов исследования использовали *Desulfosporosinus* sp.NP, *Desulfovibrio* sp.VK. Штамм *Desulfosporosinus* sp.NP выделен из пробы ШГ-14-1, отобранной в августе 2014 г на территории месторождения Шерловая гора со дна скважины (глубина скважины – 7,5 м, высота водяного столба около 1 м) в карьере по добыче руды. Значение pH воды составляло 2,58, температура – 6,5–6,6°C. Полученная культура представлена подвижными, слегка изогнутыми палочками с округлыми концами размером от 2,5 до 4,0 мкм. Штамм образует овальные споры паратерминально. Штамм *Desulfovibrio* sp.VK выделен из пробы ШГ-14-5, полученной в августе 2014 г. с территории Акатуйского месторождения Забайкальского края. Место отбора пробы представляло собой выход из штольни, затопленный водой, где находились остатки деревянных конструкций. Часть деревянных сооружений была покрыта слоистыми матами с верхним слоем зеленого цвета, далее – слои желтого, белого и черного цветов. Температура воды в месте отбора пробы составляла 2,8°C, pH 7,15 и Eh = +271 мВ. Полученная культура представлена подвижными вибрионами.

Культивирование проводили в биореакторе Sartorius Biostat Bplus в полунепрерывном режиме на среде Видделя и Бака (Widdel & Bak, 1992) с добавлением лактата и фруктозы. Для создания анаэробных условий биореактор продували газообразным азотом марки О.С.Ч, N₂ поступал в нижнюю часть реактора через диффузор барботера. Температуру в биореакторе поддерживали на уровне 28°C. В питательную среду вносили инокулят из расчета 10% от объема среды (объем биореактора составил 2 л), посевной материал штамма *Desulfosporosinus* sp.NP (5%) и штамма *Desulfovibrio* sp.VK (5%). Начальное значение pH было установлено на

уровне 4,5. Ежедневно из биореактора производили отбор проб. В полученных пробах измеряли концентрацию сероводорода и белка по методу Лоури, а также проводили микроскопирование в 30 полях для определения численности доминирующей культуры.

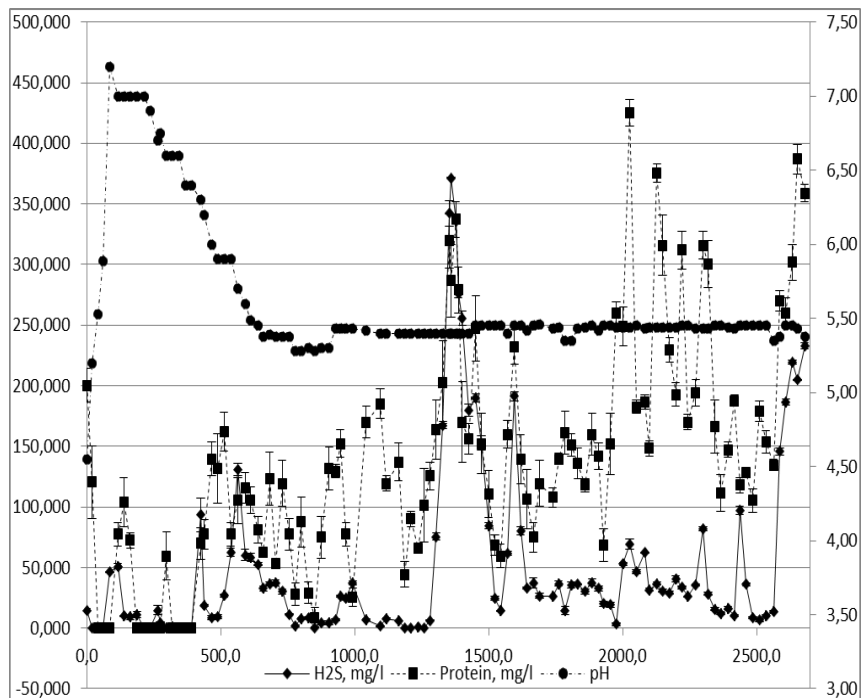


Рис. 1. Изменение показателей сероводорода, pH и белка при культивировании бинарной культуры СРБ в ферментере

После достижения значения pH 7,2 в точке 86 ч уровень водородного показателя понижали на 0,1 единицу в сутки с помощью системы автоматической коррекции pH. В точке 538 ч бинарная культура достигла равновесия (pH 5,9, численность штамма VK – $2.6 \cdot 10^5$, штамма NP – $4.5 \cdot 10^5$). При дальнейшем снижении pH до уровня 5,38 в смешанной культуре преобладал штамм NP, так, в точке 591 ч при pH 5,6 численность штамма VK составила – $4,9 \cdot 10^4$, штамм NP – $1,2 \cdot 10^6$. В точке 756 ч в среду стали

подавать в качестве источника органического питания только фруктозу, после этого наблюдали резкое снижение численности штамма VK; начиная с точки 801 ч попадались лишь единичные клетки *Desulfovibrio sp.* VK.

При дальнейшем снижении уровня pH до значения 5,28 (точка 851 ч), наблюдали резкое снижение численности клеток штамма NP. После проведения коррекции pH до уровня 5,4 в точке 1095 ч численность NP выросла до уровня $1,0 \cdot 10^6$. В точке 1761 ч в питательную среду добавили ионы Cu^{2+} (в виде $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) в концентрации 50 мг/л. После этого наблюдали активный рост *Desulfovibrio sp.* VK начиная с точки 1910 ч, на рост штамма *Desulfosporosinus sp.* NP наличие в питательной среде ионов Cu^{2+} в данной концентрации никак не отразилось.

Проведенное исследование выявило возможность успешного культивирования бактерий рода *Desulfosporosinus* в бинарной культуре в условиях полунепрерывного культивирования в биореакторе. Найдены пороговые значения pH для культивирования штаммов бинарной культуры, для штамма *Desulfosporosinus sp.* NP и штамма *Desulfovibrio sp.* VK эти показатели составили 5,28 и 5,4 соответственно.

Литература

1. Muzyer G., Stams A.J.M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria // Nature Reviews Microbiology. 2008. № 6. P. 441–454.
2. Johnson D.B., Ghauri M., McGinness S. Biogeochemical cycling of iron and sulphur in leaching environments // FEMS Microbiol. 1993. № 11. P. 63–70.
3. Moreau J.W., Zierenberg R.A., Banfield J.F. Diversity of dissimilatory sulfite reductase genes (*dsrAB*) in a salt marsh impacted by long-term acid mine drainage // Appl Environ Microbiol. 2010. № 76. P. 4819–4828.
4. Nordstrom D.K. Advances in the hydrogeochemistry and microbiology of acid mine waters // Int Geol Rev. 2000. № 42. P. 499–515.
5. Koschorreck M. Microbial sulphate reduction at a low pH // FEMS Microbiol Ecol. 2008. № 64. P. 329–342.
6. Peiffer S., Oldham C., Salmon U., Lilliecrap A., Küsel K. Does iron cycling trigger generation of acidity in groundwaters of Western Australia? // Environ Sci Technol. 2009. Vol. 43 (17). P. 6548–6552.

7. Lee Y.J., Romanek C.S., Wiegel J. Desulfosporosinus youngiae sp. nov., a spore forming, sulfate-reducing bacterium isolated from a constructed wetland treating acid mine drainage // Int J Syst Evol Microbiol. 2009. Vol. 59. P. 2743–2746.

8. Widdel F., Bak F. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria // The Prokaryotes / eds. A. Balows, H.G.Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer,). 2nd ed. Berlin : Springer-Verlag, 1992. Vol. 4. P. 3352–3378.

**ДОМИНИРУЮЩИЕ ФИЛОТИПЫ BACTERIA
В ОСАДКАХ И НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУРАХ,
ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ОТХОДОВ ПОЛИСУЛЬФИДНЫХ
МЕСТОРОЖДЕНИЙ ЗАБАЙКАЛЬСКОГО КРАЯ***

**А.Л. Герасимчук, Т.С. Федорова, А.В. Игошин,
Д.А. Ивасенко, О.В. Карначук**

Национальный исследовательский Томский
государственный университет, Томск, Россия

Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) – важные агенты очистки кислых шахтных дренажных вод (КШД) от тяжелых металлов. Как правило, отходы добычи сульфидных руд характеризуются низким рН и высокой концентрацией металлов. Соответственно, СРБ, используемые для очистки, должны быть устойчивы к высокой концентрации протонов и ионов металлов. Толерантные формы могут быть выделены из экосистем, ассоциированных с добычей металлов.

Целью данного исследования было получение накопительных культур СРБ из дренажных вод отходов добычи полисульфидных руд и их мониторинг методом амплификации фрагмента гена 16S рРНК и разделения их методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях (ПЦР-ДГГЭ).

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