

**РОСТ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА В
ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ**К.М. Климова

Научный руководитель: к.б.н. Ю.А. Франк

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: ksenia.m.klimova@gmail.com**GROWTH OF SULFATE-REDUCING BACTERIA IN THE HIGH CONCENTRATIONS OF IRON
IONS**K.M. Klimova

Scientific Supervisor: Y.A. Frank, PhD

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: ksenia.m.klimova@gmail.com

Abstract. Sulphate-reducing bacteria (SRB) are anaerobic microorganisms that use sulphate as a terminal electron acceptor in, for example, the degradation of organic compounds. They are ubiquitous in anoxic habitats, where they have an important role in both the sulphur and carbon cycles. SRB can cause a serious problem for industries, such as the offshore oil industry, because of the production of sulphide, which is highly reactive, corrosive and toxic. However, these organisms can also be beneficial by removing sulphate and heavy metals from waste streams. Although SRB have been studied for more than a century, it is only with the recent emergence of new molecular biological and genomic techniques that we have begun to obtain detailed information on their way of life.

Введение. Известно, что геологические породы и минеральные отложения, созданные гидротермальной циркуляцией, охватывают микробные сообщества с экологическими и функциональными характеристиками, соответствующими химии их основного субстрата [1]. Кроме того, было показано, что микроорганизмы взаимодействуют со своей породой или минеральной средой путем растворения и осаждения минералов.

Исследование физиологического и филогенетического разнообразия прокариот глубинных экосистем с использованием культивирования и молекулярных подходов показало их важную экологическую роль в биохимических циклах углерода (C), азота (N), серы (S) и железа (Fe) [2]. Для микроорганизмов железо является потенциальным субстратом как для запасания энергии (восстановление железа), так и для дыхания (окисление железа). Кроме того, Fe²⁺ используется как кофактор во многих ферментах [3]. Сульфидное осаждение металлов из гидрометаллургических растворов представляет значительный промышленный интерес, поскольку оно может обеспечить селективность в разделении металлов и вторичное использование железа.

Целью данной работы является определение устойчивости к ионам железа (Fe²⁺) для штаммов сульфатредуцирующих бактерий, выделенных из геотермально нагреваемых вод в Томской области и Забайкальском крае. Представители типов Firmicutes (штамм *Desulfotomaculum* Bu1-1) Nitrospirae (штамм *Thermodesulfovibrio* V2) являются термофильными бактериями с оптимумом для роста 55-65 °С. В

качестве референсного штамма, не связанного с геотермальными местообитаниями, был выбран штамм *Desulfovibrio* A2 (Deltaproteobacteria), растущий при 28 °С.

Материалы и методы исследования. Штаммы культивировались на стандартной среде Видделя (Widdel, Bak, 1992) при нейтральном pH=7.0-7.2. Среда содержала (на литр) 1 г NaCl, 0.4 г MgCl₂ 6H₂O, 0.15 г CaCl₂ 2H₂O, 4.0 г Na₂SO₄, 0.25 г NH₄Cl, 0.2 г KН₂PO₄, 0.5 г KCl, 1 мл микроэлементного раствора, 1 мл раствора витамина, и 1 мл раствора селенит-вольфрамата. В среду перед посевом добавляли 0,16 мл лактата на 100 мл среды (для штаммов *Thermodesulfovibrio* V2 и *Desulfovibrio* A2) или 0.5 мл изобутератана 100 мл среды (для штамма *Desulfotomaculum* Bu1-1). В качестве источника ионов Fe²⁺ к среде добавляли водный раствор FeSO₄×7H₂O, постепенно увеличивая концентрацию в каждом пассаже. В качестве дополнительного источника ионов вместе с инокулятом добавляли железную скрепку. Рост штамма *Thermodesulfovibrio* V2 происходил при температуре 65С°, *Desulfotomaculum* Bu1-1 при 50С°, *Desulfovibrio* A2 при 28С°. Все культуры были помещены в термостаты и росли в полной темноте. Подсчет клеток проводили в конце логарифмической фазы роста с использованием фазово-контрастного микроскопа. Эксперимент выполняли в трех параллельных повторностях.

Результаты. Все исследованные штаммы сульфатредуцирующих бактерий показали высокую устойчивость к ионам данного металла. Рост штамма *Thermodesulfovibrio* V2 зафиксирован при концентрации 2.5 г/л (Рисунок 1, А), *Desulfotomaculum* Bu1-1 при 2.0 г/л (Рисунок 1, Б). *Desulfovibrio* A2 способен к росту при содержании железа 5.0 г/л, хотя численность клеток снижалась уже при его концентрации 3.0 г/л (Рисунок 1, В).

Ранее было показано, что *Desulfovibriosp.* A2 способен переносить до 800 мг/л меди в жидких средах, используя лактат в качестве донора электронов и источника углерода, что превышает предельные допустимые концентрации данного металла для других бактериальных штаммов в 10-16 раз [4]. Исследование генома устойчивых к железу микроорганизмов предполагает как минимум один ген, участвующий в гомеостазе меди и железа: Cu-Fe протеин (DA2_2478), связанный с белком толерантности к железу штамма *Desulfovibrio aminophilus* DSM12254 [5]. Так же генетические детерминанты для Fe-резистентности могут быть связаны с плазмидами. Кроме того, есть еще один механизм устойчивости к железу – клетки переносят высокие начальные концентрации ионов металла в связи с постепенным осаждением сероводородом в нерастворимые формы.

Заключение. Штаммы *Desulfotomaculum* Bu1-1 и *Thermodesulfovibrio* V2 также показали высокую толерантность к ионам двухвалентного железа. Механизмы их резистентности к могут быть схожи с механизмами, показанными в работах [4] и [5]. В дальнейшем планируются исследования геномов данных микроорганизмов и поиск генов, отвечающих за устойчивость к ионам Fe²⁺.

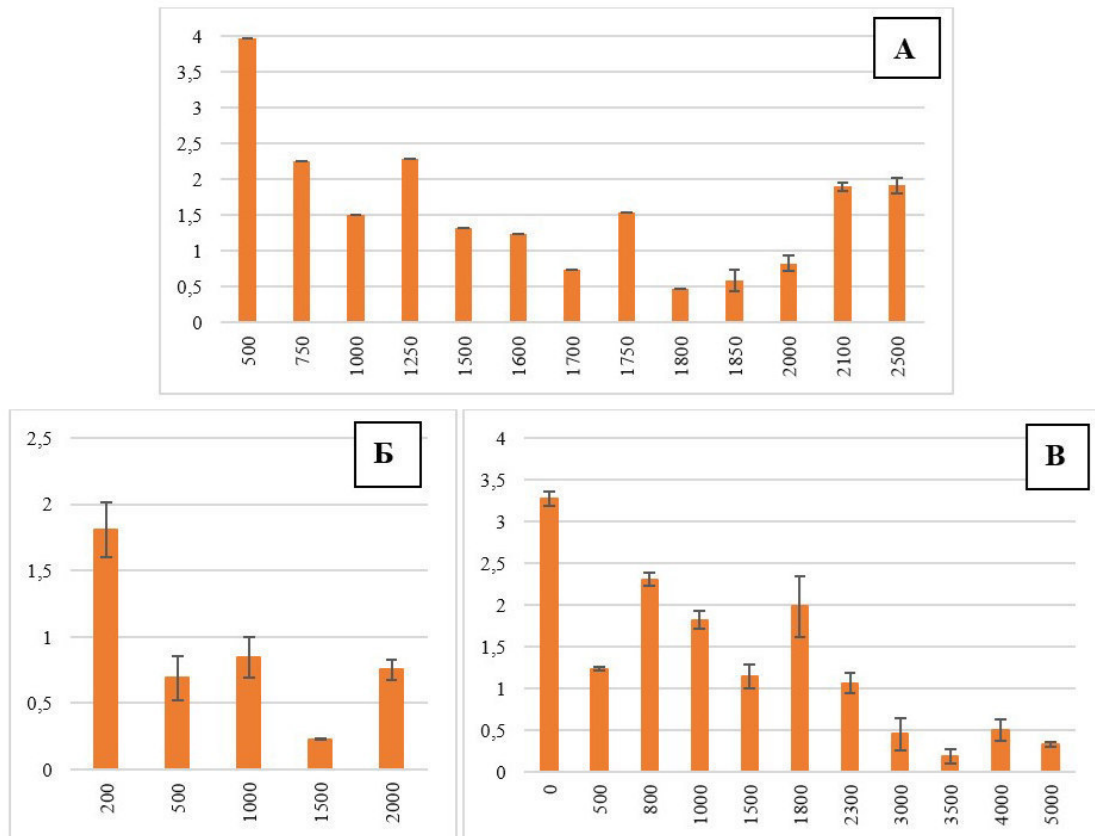


Рис. 1. Диаграммы роста штаммов при повышении концентрации железа. А – динамика роста штамма V2. Б – динамика роста штамма VuI-1. В – динамика роста штамма A2. Вертикальная и горизонтальная оси - количество клеток во флаконе (клеток $\times 10^6/\text{мл}$) и концентрация железа (Fe^{2+}) в среде Видделя ($\text{мг}/\text{дм}^3$)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wheat, C. G., Mottl, M. J., Fisher, A. T., Kadko, D., Davis, E., Baker, E. (2004). Heat flow through a basaltic outcrop on a sedimented young ridge flank. *Geochem. Geophys. Geosyst.*, no. 5, pp. 118-136.
2. Yucel, M., Gartman, A., Chan, C. S., George, W., Luther, I. (2011). Hydrothermal vents as a kinetically stable source of iron-sulphide-bearing nanoparticles to the ocean. *Nat. Geosci.*, no. 4, pp. 367-371.
3. Emerson, D. (2016). The irony of iron – biogenic iron oxides as an iron source to the Ocean. *Front. Microbiology*, no. 6, pp. 321-336.
4. Mancini, S., Abicht, H., Karnachuk, O., 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. *Journal of bacteriology*, no. 193, pp. 6793-6794.
5. Karnachuk, O. V., Sasaki, K., Gerasimchuk, A. L., Sukhanova, O., Ivashenko, D. A., Kaksonen, A. H., Puhakka, J. A., Tuovinen, O. H. (2008). Precipitation of Cu-sulfides by copper-tolerant *Desulfovibrio* isolates. *Geomicrobiol. Journal*, no. 25, pp. 219-227.