



Биолог. журн. Армении, 1 (65), 2013

СЕРООКИСЛЯЮЩАЯ БАКТЕРИЯ, ВЫДЕЛЕННАЯ ИЗ ПУЛЬПЫ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ ЦИНКОВОГО КОНЦЕНТРАТА

А.К. ВАРДАНЯН, А.Н. ХАЧАТРЯН, Л.С. МАРКОСЯН,
ВАРДАНЯН

Н.С.

НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА, Институт микробиологии
avivardan@gmail.com, nvard@sci.am

Изучены основные фенотипические свойства штамма SO-1 сероокисляющей бактерии, выделенной из пульпы выщелачивания цинкового концентрата. Клетки бактерии представляют собой палочки размером 0,3-0,5 x 0,7-2,0 мкм. Способны окислять элементарную серу и тетраионат. Оптимальные условия роста – 35°C и pH 2,7-3,0. Выделенный штамм SO-1 является факультативным хемолитоавтотрофом. Дрожжевой экстракт в концентрации 0,005-0,01% стимулирует рост бактерии и окисление элементарной серы. Анализ нуклеотидной последовательности 16S рРНК показал, что выделенный штамм SO-1 образует единый кластер с соответствующей нуклеотидной последовательностью типового штамма *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377, имея с ним уровень сходства 97,5%. Штамм SO-2 сероокисляющей бактерии, выделенной ранее из пульпы выщелачивания медного концентрата, проявляет высокий уровень сходства с соответствующей нуклеотидной последовательностью типового штамма *Acidithiobacillus albertensis* DSM-14366. Можно сделать вывод, что штамм SO-2 является штаммом вида *A. albertensis*, а штамм SO-1, участвующий в окислении цинкового концентрата, является новым видом рода *Acidithiobacillus*, отличным от *A. thiooxidans*.

Сероокисляющие бактерии – цинковый концентрат–нуклеотидная последовательность –идентификация бактерий

Ուսումնասիրվել են ցինկի խտանյութի տարրավազման պուլպից մեկուսացված ծծումբ օքսիդացնող բակտերիայի հիմնական ֆենոտիպական հատկանիշները: Բջջիչները ձողաձև են, 0,3- 0,5 x 0,7-2,0 մկմ մեծության: Բակտերիան ընդունակ է օքսիդացնելու էլեմենտային ծծումբ և տետրաթիոնատ: Աձի օպտիմալ ջերմաստիճանը 35°C է, pH-ի օպտիմալ արժեքները՝ 2,7-3,0: Մեկուսացված SO-1 շտամը հանդիսանում է ֆակուլտատիվ քեմոլիտոտրոֆ: Խմորասնկային էքստրակտը 0,005-0,01% խտության դեպքում խթանում է բակտերիայի աճը և ծծմբի օքսիդացումը: 16S ռԻԼՆԹ-ի նուկլեոտիդային հաջորդականության անալիզը ցույց է տվել, որ մեկուսացված բակտերիան առաջացնում է միասնական կլաստեր *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377 տիպային շտամի համապատասխան նուկլեոտիդային հաջորդականության հետ՝ ցուցաբերելով 97,5% նմանություն: Պղնձի խտանյութի պուլպից նախկինում մեկուսացված ծծումբ օքսիդացնող SO-2 շտամը ցուցաբերել է նմանության բարձր մակարդակ *Acidithiobacillus albertensis* DSM-14366 տիպային շտամի համապատասխան հաջորդականության հետ: Եզրակացվում է, որ SO-2 շտամը պատկանում է *A. albertensis* տեսակին, իսկ ցինկի խտանյութի տարրավազման մասնակցող SO-1 շտամը հանդիսանում է *A. thiooxidans*-ից տարբեր *Acidithiobacillus* գեղի նոր տեսակ:

Ծծումբ օքսիդացնող բակտերիաներ – ցինկի խտանյութ–նուկլեոտիդային հաջորդականություն – բակտերիաների նույնացում

The main phenotypic features of sulfur-oxidizing bacteria str.SO-1 isolated from leaching pulp of zinc concentrate have been studied. The cells of bacteria are rods in the size 0,3-0,5x0,7-2,0 mkm. They are capable of oxidizing elemental sulfur and tetrathionate with optimal temperature of growth 35°C and pH 2,7-3,0. The isolated str. SO-1 is considered to be a facultative chemolithoautotrophic. Yeast extract in the concentrations range of 0,005-0,01% stimulates the growth of bacteria and oxidation of element sulfur. The analysis of 16S rRNA gene sequences has shown that the isolated str. SO-1 forms a single cluster with corresponding sequences of a type strain of *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19 377 having with it 97,5% similarity. Str.SO-2 of sulfur-oxidizing bacteria isolated earlier from leaching pulp of copper concentrate shows a high level of similarity with corresponding sequences of a type strain of *Acidithiobacillus albertensis* DSM-14366. It is concluded that str.SO-2 represents a strain of genus *A. albertensis* while str.SO-1 participating in the oxidation of zinc concentrate is a new species of genus *Acidithiobacillus* distinct from *A.thiooxidans*.

Sulfur oxidizing bacteria – zinc concentrate-gene sequences – identification of bacteria

Ведущую роль в окислении элементарной серы в природных условиях и в искусственных системах выщелачивания играет экстремально ацидофильная бактерия *A.thiooxidans* (= *Thiobacillus thiooxidans*) [4]. К настоящему времени выделен ряд других облигатно автотрофных ацидофильных бактерий, способных окислять элементарную серу [8,16,18]. Однако из них только *Thiobacillus albertensis* [8] и *Acidithiobacillus caldus* [15] описаны как отдельные виды, тогда как остальные бактерии (*Thiobacillus concretivorus*, *Thiobacillus kabobis*, *Thiobacillus capsulatus*), ввиду отсутствия существенных различий от *A. thiooxidans*, в последнем издании Берги были отнесены к синонимам *A.thiooxidans* [6]. Позднее на основании изучения нуклеотидной последовательности 16S рРНК *Thiobacillus albertensis* был включен во вновь созданный род *Acidithiobacillus*. Среди указанных бактерий особый интерес ученых привлекает *A.caldus*, способная окислять элементарную серу при повышенных температурах. По данным ряда исследователей, *A.caldus* является основной сероокисляющей бактерией в установках биоокисления золотосодержащих концентратов, функционирующих при 40°C [13,14]. По мнению авторов, роль *A. caldus* в сообществе хемолитотрофных бактерий в процессе биоокисления арсенопирита заключается в удалении ингибирующего слоя серы, образующегося на поверхности минерала или в обеспечении миксотрофного и гетеротрофного роста других серо- и железоокисляющих бактерий [12].

Что касается *A. albertensis*, то практически отсутствуют данные о потенциальной роли этой бактерии в биотехнологии металлов.

Проведенные нами ранее исследования по выщелачиванию комплексных медных и цинковых концентратов природной ассоциацией хемолитотрофных бактерий показали, что в процессе их бактериального окисления под действием соответствующих физико-химических и минералогических факторов формируются особые по своему составу сообщества, состоящие преимущественно из сероокисляющих бактерий, а также железоокисляющих лептоспирилл, наиболее адаптированных к условиям выщелачивания данных концентратов.

Из пульпы бактериального выщелачивания указанных концентратов были изолированы в чистую культуру два штамма мезофильных сероокисляющих бактерий [2,5].

Целью настоящих исследований явилось изучение основных фенотипических свойств сероокисляющих бактерий, выделенных нами из пульп выщелачивания цинкового и медного концентратов и их идентификация на основании анализа нуклеотидной последовательности 16S рРНК.

Материал и методика. Объектом исследования служили сероокисляющие бактерии шт. SO-1 и шт. SO-2, выделенные из пульпы выщелачивания медного и цинкового концентратов. Инокуляционным материалом для получения накопительной культуры служили пробы пульпы выщелачивания. Выделение бактерий проводили на среде 9К, используя в качестве источника энергии элементную серу в виде порошка. Сера стерилизовали отдельно текучим паром и добавляли к среде непосредственно перед высевом, pH среды устанавливали 3,0-3,5 с помощью 10 N H₂SO₄. Инкубирование проводили в стационарных условиях при 37°C. Чистую культуру получали путем посева на твердую среду, содержащую 0,6% агарозы (Serva) и 5 мМ тетрагидрата натрия (Na₂S₄O₆ · 2H₂O) в качестве источника энергии. Чистоту выделенных культур проверяли посевом на ту же среду, содержащую 0,05 и 0,1% дрожжевого экстракта или глюкозы.

Окрашивание клеток по Граму проводили по методу Хукера [3]. Спорообразование проверяли посевом клеток после термальной обработки (кипячение в водяной бане в течение 30 мин) в вышеуказанную питательную среду, а также окрашиванием спор [3] и прямым микроскопированием.

Опыты по изучению физиологических особенностей проводили в стационарных условиях. О росте бактерий судили по увеличению оптической плотности среды, снижению pH, а также по интенсивности образования SO₄²⁻ в результате окисления элементной серы. Сульфат-ионы определяли по методу Додгсона [11].

Клетки просматривали под микроскопом Leica DM500 trinocular (Ч1000), Программное обеспечение Digital Camera EC3 Leica Microsystem (Ч10).

Выделение ДНК из биомассы бактерий проводили согласно методу Бирнбойма и Доли [7]. Концентрация полученных препаратов ДНК при использовании данного метода составляла 30-50 мкг/мл.

ПЦР гена 16S рРНК. Для проведения полимеразной цепной реакции и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК была использована универсальная праймерная система [19]. Объем амплификационной смеси составлял 50 мкл и имел следующий состав: 1× буфер ДНК полимеразы BioTaq (17 мМ (NH₄)₂SO₄, 67 мМ трис-HCl, pH 8,8, 2 мМ MgCl₂); по 12,5 нмоль каждого из dNTP, 50 нг ДНК-матрицы; по 5 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК полимеразы BioTaq (Диалат ЛТД, Россия).

Температурно-временной профиль ПЦР был следующим: первый цикл – 94°C x 9 мин, 55°C x 1 мин, 72°C x 2 мин; последующие 30 циклов – 94°C x 1 мин, 55°C x 1 мин, 72°C x 2 мин; завершающий цикл – 72°C x 7 мин.

Выделение и очистку продуктов ПЦР проводили из легкоплавкой агарозы с применением набора реактивов Wizard PCR Preps (Promega, США), согласно рекомендациям производителя.

Секвенирование ПЦР-продуктов. Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК, проводили по методу Сэнгера с соват. [20] с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Inc., USA) на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, Inc., USA) согласно инструкциям производителя. При этом для секвенирования использовали праймеры [19], и чтение проводили в двух направлениях.

Анализ нуклеотидных последовательностей 16S рРНК. Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК изучаемых штаммов проводили с помощью программного пакета BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) [19].

Результаты и обсуждение. *Микробиологический анализ пульпы.* Исследованиями выявлено, что в процессе выщелачивания цинкового и медного концентратов природной ассоциацией хемолитотрофных бактерий к концу опыта в пульпах доминировали сероокисляющие бактерии. Их количество достигало 10⁸–10⁹ кл./мл, в то же время численность железоокисляющих бактерий, представленных *Leptospirillum* spp. бактериями и *Acidithiobacillus ferrooxidans*, не превышала 10⁴–10⁵ кл./мл. Это объясняется тем, что по мере выщелачивания указанных концентратов, условия в пульпе меняются и становятся более благоприятными для роста сероокисляющих бактерий. Как уже отмечалось нами ранее, это связано с накоплением в среде эле-

ментной серы – продукта химического и бактериального окисления (особенно бактериями *Leptospirillum spp.*) минералов цинка и меди [2, 5].

Культуральные и морфофизиологические свойства. Из пульпы выщелачивания цинкового и медного концентратов природной ассоциацией ХБ были изолированы два штамма грамтрицательных сероокисляющих бактерий: шт. SO-1 и шт. SO-2, соответственно. Основные физиологические свойства шт. SO-2, выделенного из пульпы выщелачивания медного концентрата, представлены в ранее опубликованной работе [5].

Исследования показали, что при росте шт. SO-1 на твердой среде с тетрагидратом образуются регулярные колонии молочного цвета, покрытые слоем слизи. Клетки бактерии представляют собой палочки размером 0,3-0,5 x 0,7-2,0 мкм (рис. 1), тогда как клетки шт. SO-2 по мере роста превращаются в длинные нити, иногда переплетенные между собой [5].

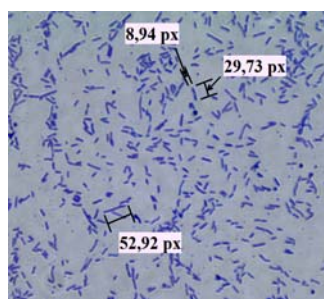


Рис. 1. Микрофотография окрашенных генциановым фиолетовым клеток шт. SO-1 (1пиксель (px) = 263,6 микрометр)

В качестве источника энергии бактерии могут использовать элементарную серу (S^0), а также тетрагидрат ($Na_2S_4O_6 \cdot 2H_2O$). На среде с элементарной серой через 5-7 сут. наблюдается интенсивный рост бактерии, увеличение оптической плотности среды и ее подкисление в результате активного образования серной кислоты.

Рост выделенных бактерий на среде с элементарной серой возможен в интервале 25-40°C. Оптимальная температура роста для шт. SO-1 – 35°C (рис. 2).

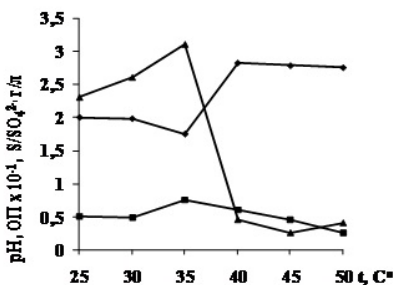


Рис. 2. Влияние температуры на рост бактерии шт. SO-1 и окисление элементарной серы (продолжительность – 9 сут.)
 ◆ - pH, ■ - оптическая плотность (ОП × 10⁻¹), ▲ - S/SO₄²⁻, г/л

Рост бактерий наблюдается в диапазоне рН 2,0-6,0. Максимальная скорость роста и окисления элементарной серы проявляется при рН 2,7-3,0 (рис.3).

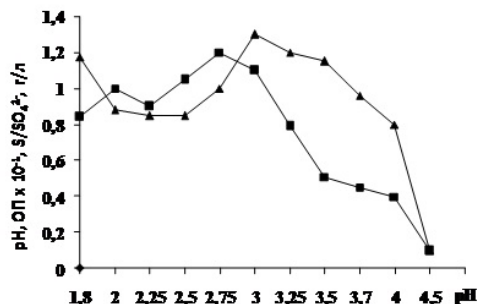


Рис. 3. Рост бактерии шт.SO-1 и окисление элементарной серы в зависимости от рН среды (продолжительность ■ сут.) - оптическая плотность (▲ x 10⁻¹), - S/SO₄²⁻, г/л

Исследования показали, что дрожжевой экстракт в концентрации 0,005-0,01% в среде стимулирует рост бактерий и окисление ими элементарной серы. Дальнейшее повышение концентрации дрожжевого экстракта подавляет рост бактерий и окислительные процессы (рис. 4).

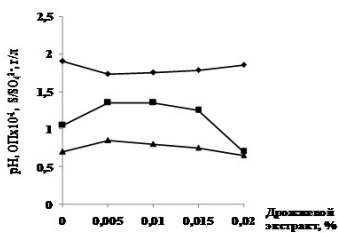


Рис. 4. Влияние концентрации дрожжевого экстракта на рост шт.SO-1 и окисление элементарной серы (продолжительность – 10 сут.)
◆ - рН, ▲ - оптическая плотность (ОП x 10⁻¹), ■ - S/SO₄²⁻, г/л

Полученные результаты позволяют заключить, что выделенный шт.SO-1 является факультативным хемолитоавтотрофом, который получает энергию для своей жизнедеятельности в процессе окисления неорганических веществ, в частности восстановленных соединений серы, при этом фиксируя углекислоту атмосферы или используя органические источники углерода.

Филогенетический анализ. Идентификация выделенных штаммов, входящих в состав микробной ассоциации при выщелачивании цинкового и медного концентратов, была осуществлена путем анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рПНК.

Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рПНК. Для исследуемых шт.SO-1 и шт.SO-2 была определена практически полная последовательность (1480 и 1478 нуклеотидов соответственно) амплификата гена, кодирующего 16S рПНК, что соответствует позициям с 20 по 1505 и с 19 по 1502 по номенклатуре *E. coli*.

Предварительный скрининг по базе данных GenBank выполнен при использовании BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) [9].

Из полученных данных следует, что филогенетически наиболее близкими к нуклеотидным последовательностям 16S рПНК исследованных штаммов SO-1 и SO-2

оказались соответствующие последовательности двух видов бактерий рода *Acidithiobacillus*: *A. albertensis* штамм DSM 14366 (NR_028982) (типовой штамм вида *A. albertensis*) и *A. thiooxidans* ATCC19377 (Y11596) (типовой штамм вида *A. thiooxidans*).

Для более точного определения принадлежности исследованных штаммов было построено филогенетическое дерево (алгоритм-neighbor-joining).

Согласно полученной дендрограмме, последовательность 16S рРНК штамма шт. SO-1 с невысоким уровнем достоверности (56%) образует единый кластер с соответствующей нуклеотидной последовательностью типового штамма вида *A. thiooxidans* ATCC19377 (уровень сходства последовательностей – 97,5%), а нуклеотидная последовательность 16S рРНК штамма SO-2 с низким уровнем достоверности (менее 50%) образует единый кластер с соответствующей последовательностью типового штамма вида *A. albertensis* шт. DSM 14366 (уровень сходства последовательностей – 99,9%) (табл.1, рис.5).

Табл. 1. Уровни сходства нуклеотидных последовательностей 16S рРНК штаммов SO-1, SO-2 и филогенетически ближайших видов

| Штаммы бактерий | Штамм SO-1 | Штамм SO-2 | <i>A. thiooxidans</i> ATCC 19377 T (AY552087) | <i>A. albertensis</i> DSM 14366 T NR (028982) |
|---|------------|------------|---|---|
| Штамм SO-1 | ID | 0.997 | 0.975 | 0.997 |
| Штамм SO-2 | 0.997 | ID | 0.974 | 0.999 |
| <i>A. thiooxidans</i> ATCC 19377 T (AY552087) | 0.975 | 0.974 | ID | 0.973 |
| <i>A. albertensis</i> DSM 14366 T NR (028982) | 0.997 | 0.999 | 0.973 | ID |

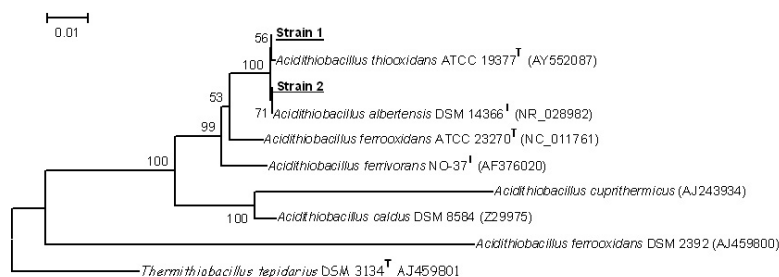


Рис. 5. Филогенетическое положение исследованных штаммов внутри рода *Acidithiobacillus*. Алгоритм построения дендрограммы – ‘neighbor-joining’ на основании сравнения 500 альтернативных деревьев. Слева сверху указан масштаб эволюционных расстояний. Достоверность ветвления указана в процентах. Указаны величины более 50%.

В качестве outgroup использована нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК типового вида *Thermithiobacillus tepidarius* DSM 3134.

Принимая во внимание тот факт, что уровень сходства нуклеотидных последовательностей типовых штаммов *A. thiooxidans* и *A. albertensis* составляет 97,3%, можно сделать вывод о том, что штамм SO-1 может являться новым видом рода *Acidithiobacillus*, отличным от *A. thiooxidans*, а штамм SO-2 – штаммом вида *A. albertensis*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Марусина А.И., Кравченко И.К., Быкова С.А., Колганова Т.В., Гальченко В.Ф. Изучение нуклеотидных последовательностей *piñ* генов у представителей метанотрофных бактерий. Микробиология, 71, 4, с.500-508, 2002.
2. Варданян Н.С., Варданян А.К. Селективное извлечение металлов из цинкового концентрата ассоциацией хемолитотрофных бактерий. Прикл. биохимия и микробиология, 47, 5, с.566 -571, 2011.
3. Герхардт Ф. и др., Методы общей бактериологии: в 3т. М., Мир, 1,1983.
4. Каравайко Г.И., Кузнецов С.И., Голомзик А.И. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. М., Наука, 248 с., 972.
5. Нагдалян С.З., Кочарян Е. М., Варданян Н.С. Особенности сообщества хемолитотрофных бактерий при выщелачивании медного концентрата. Биолог. журн. Армении, 61, 1, с.18-23, 2009.
6. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology /Eds. Staley J.T., Bryant M.P., Pfenning N., Holt J.G./, 3, p.1842- 1853, 1989.
7. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res., 7, 6, p.1513-1523, 1979.
8. Bryant R.D., McGroarty K.M., Costerton J.W. Isolation and characterization of a new acidophilic *Thiobacillus species* (T.albertis). Canad. J. Microbiol, 23, 9, p.1159-1170,1983.
9. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T. L., BLAST: architecture and applications. BMC Bioinformatics, Dec. 15; 10, 421, 2009.
10. Coram, N.J. and Rawlings, D.E. Molecular relationship between two groups of Leptospirillum and the finding that Leptospirillum ferriphilum sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks which operate at 40⁰C. Appl. Environ. Microbiol., 68, p.838-845, 2002.
11. Dodgson R.S. Biochem.J. Determination of Inorganic Sulphate in Studies on the Enzymic and non-enzymic Hydrolysis of Carbohydrate and Other Sulphate Esters, 78, p.312-319, 1961.
12. Dopson M., Lindstrom E.B. Potential role of *Thiobacillus caldus* in Arsenopyrite Leaching. Appl. Environ. Microbiol., 65, 1, p.36-40, 1999.
13. Dopson M., Lindstrom E.B. Analysis of Community Composition during Moderately Thermophilic Bioleaching of Pyrite, Arsenical pyrite, and Chalcopyrite. Microbial Ecology, 48, 1, p.19-28, 2004.
14. Goebel B.M., Stackebrandt E. Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. Appl. Environ. Microbiol., 60, p.1614-1621, 1994.
15. Hallberg, K.B. and Lindström, E.B. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. Microbiology, 140, 3451-3456, 1994.
16. Hallberg, K.B. and Johnson, D.B. Biodiversity of acidophilic prokaryotes. Adv. Appl. Microbiol. 49, 37-84, 2001.
17. Kelly D.P., Wood A.P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, p.511-516, 2000.
18. Laishly E.J., Rae K., Dillman A.M., Bryant R.D., Characterization of a new acidophilic *Thiobacillus isolate* (*Thiobacillus capsulatus*). Canad. J. Microbiol. 34, p.960-966, 1988.
19. Lane D.J. 16S/23S sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt E. a. Goodfellow M. (Eds.). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., p.115-175, 1991.
20. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, p.5463-5467, 1977.

Поступила 11.06.2012