

Օրիգինալ հոդվածներ • Оригинальные статьи • Original articles

Биол. журн. Армении, 1-2 (53), 2001

УДК 579.846

**ОКИСЛЕНИЕ СЕРЫ И ЖЕЛЕЗА ШТАММАМИ
ТЕРМОАЦИДОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ В МИКСОТРОФНЫХ
УСЛОВИЯХ**

Н.С. ВАРДАНЯН*, А.В. ГАСПАРЯН, В.П. АКОПЯН***

**Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян*

***Республиканский центр депонирования микробов НАН и Министерства образования
и науки Республики Армении, 378510, г. Абовян*

Штаммы термоацидофильных бактерий 69 и 86 способны расти хемолитоавтотрофно. Однако рост бактерий и окисление Fe^{2+} и S^0 стимулируются в миксотрофных условиях в присутствии органических веществ. Показано, что глюкоза в зависимости от ее концентрации может ускорить или ингибировать окисление Fe^{2+} и S^0 . Глутаминовая кислота в концентрации 0,02-0,1% стимулирует окисление Fe^{2+} . Установлено частичное потребление глутаминовой кислоты указанными штаммами. Аланин, пировиноградная кислота, а также раствор витаминов не оказывают заметного влияния на окисление Fe^{2+} при росте штаммов в миксотрофных условиях. Изученные штаммы в отличие от типовых штаммов сульфобацилл не способны расти хемоорганотрофно на дрожжевом экстракте, глюкозе, аланине и пировиноградной кислоте. Гетеротрофный рост бактерий способна поддерживать только глутаминовая кислота.

Թերմոափոփոքիլ բակտերիաների շտամները 69 և 86 ընդունակ են աճելու քեմոլիթոտրոֆ պայմաններում, սակայն նրանց աճը և Fe^{2+} ու S^0 -ի օքսիդացումը խթանվում են միքսոտրոֆ պայմաններում օրգանական նյութերի առկայությամբ: Պարզվել է, որ գլյուկոզը կոնցենտրացիայից կախված կարող է արագացնել կամ արգելակել Fe^{2+} ու S^0 -ի օքսիդացումը: Գլյուտամինաթթուն 0,02-0,1% կոնցենտրացիաների միջակայքում խթանում է Fe^{2+} -ի օքսիդացումը, ընդ որում նկատվել է գլյուտամինաթթվի մասնակի օգտագործում նշված շտամների կողմից: Ալանինը, պիրովինոգրաթթուն, ինչպես նաև վիտամինների լուծույթը եական ազդեցություն Fe^{2+} -ի օքսիդացման վրա չեն թողնում: Ուսումնասիրված շտամները, ի տարբերություն սուլֆոբացիլների տիպային շտամների, ընդունակ չեն աճելու քեմոօրգանոտրոֆ պայմաններում խմորասնկային էքստրակտի, գլյուկոզի, ալանինի և պիրովինոգրաթթվի առկայությամբ: Բակտերիաների հետերոտրոֆ աճը կարող է ապահովել միայն գլյուտամինաթթուն:

Isolated strains 69 and 86 of thermoacidophilic bacteria are capable to grow under chemolithotrophic conditions, but growth, as well as Fe^{2+} and S^0 oxidation is stimulated in presence of organic substances. Glucose, depending on its concentrations can accelerate or inhibit Fe^{2+} and S^0 oxidation. Glutamic acid in range of concentrations from 0,02 to 0,1% stimulates Fe^{2+} oxidation. The partial utilization of glutamic acid is observed. Alanine, pyruvic acid, as well as solution of vitamin's mixture are not affected on Fe^{2+} oxidation during growth of

strains under mixotrophic conditions. The strains studied, in difference with type strains of *Sulfobacillus*, cannot grow under chemoorganotrophic conditions on yeast extract, glucose, alanine and pyruvic acid. Glutamic acid can only support heterotrophic growth of these strains.

Бактерии термоацидофильные - окисление серы и железа

Термоацидофильные бактерии рода *Sulfobacillus* способны расти литоавтотрофно за счет окисления элементарной серы, двухвалентного железа и сульфидов металлов [1, 5]. Однако для оптимального роста и максимальной окислительной активности эти бактерии нуждаются в присутствии в среде органических веществ [7, 8]. О преимуществе миксотрофных условий как для роста этих бактерий, так и с точки зрения эффективности выщелачивания ими металлов, указывается в ряде работ [2, 10]. Тем не менее роль органических веществ, а также вопрос об их использовании сульфобациллами в миксотрофных условиях до настоящего времени остается не в полной мере изученным.

Целью нашего исследования являлось изучение влияния некоторых органических веществ на окисление S^0 и Fe^{2+} и возможности их использования штаммами сульфобацилл, выделенными нами из сульфидных месторождений Армении, в качестве источников энергии.

Материал и методика. Объектом исследования служили выделенные и описанные нами ранее шт. 86, 69 термоацидофильных бактерий, а также типовой штамм *Sulfobacillus thermosulfidooxidans subsp. asporogenes* 41. Бактерии выращивали на среде Браерли при 50° [3]. В качестве источника энергии использовали порошковую серу или закисное железо. Опыты проводили в 250 мл колбах, заполненных 50 мл среды, на качалке при 180 об/мин.

Для исследования миксотрофного роста к среде добавляли также дрожжевой экстракт, глюкозу, глутаминовую кислоту, аланин и пировиноградную кислоту в разных концентрациях в зависимости от поставленной цели.

Хемоорганотрофный рост бактерий изучали на среде, содержащей 0,1% вышеупомянутых органических веществ в качестве единственного источника энергии.

В опытах использовали отмытые клетки указанных штаммов. Штаммы бактерий выращивали на вышеуказанной среде, содержащей закисное железо в качестве источника энергии. В логарифмической фазе роста клетки собирали центрифугированием при 7000 г в течение 15 мин. Затем их дважды отмывали средой, подкисленной до pH 2,0. Далее навеску сырой биомассы ресуспендировали в той же среде и вносили в колбы в равных количествах.

Количество клеток в среде определяли методом десятикратных предельных разведений. Наиболее вероятное число клеток рассчитывали по таблице Мак-Креди [8].

Рост бактерий в хемоорганотрофных условиях оценивали турбидометрическим методом по мутности на ФЭК 56М.

Об интенсивности окисления серы судили по количеству образовавшегося сульфата, последний определяли спектрофотометрическим методом [11].

Количество ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} определяли отдельно комплексонометрическим методом трилоном Б [9]. Удельную железooksисляющую активность штаммов рассчитывали как количество Fe^{3+} , окисленное 1 мг биомассы.

Глюкозу определяли методом Шомоди-Нельсона [13], а также методом тонкослойной хроматографии в системе н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:3:3), проявитель - раствор анлинефталата.

Аминокислоты определяли методом тонкослойной хроматографии в системе н-бутанол - уксусная кислота - вода (60:20:20), проявитель - 0,1%-ный раствор нингидрина.

Опыты проводили в трехкратной повторности. Данные обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение. Окисление S^0 . Автотрофный рост выделенных штаммов на среде с элементарной серой выражен слабо (рис. 1). Однако добавление к среде 0,02% дрожжевого экстракта приводит к

ускорению окисления серы, проявляющегося в активном образовании SO_4^{2-} и резком снижении pH среды. Установлено, что в отношении окисления серы в миксотрофных условиях наиболее активен шт.86: за 11 дней культивирования шт. 41, 69 и 86 в стационарных условиях на среде с серой в присутствии дрожжевого экстракта образовалось 3,5; 4,2; 12,9 г/л SO_4^{2-} соответственно. При этом реакция среды снижалась от pH 3,1 до 2,2; 2,1 и 1,75 соответственно (рис. 1).

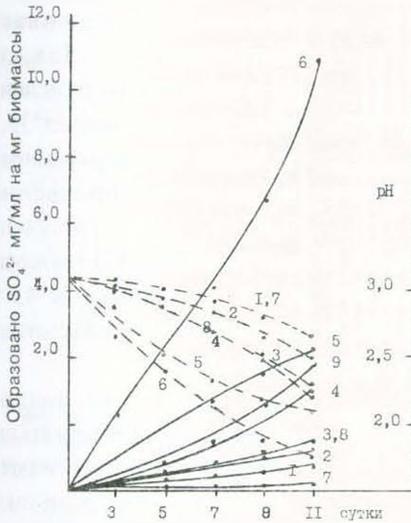


Рис. 1. Окисление S шт.41, 69 и 86: 1, 2, 3 - в автотрофных условиях, 4, 5, 6 - в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта; 7, 8, 9 - в присутствии 0,1% глюкозы. — образование SO_4^{2-} , --- изменение pH

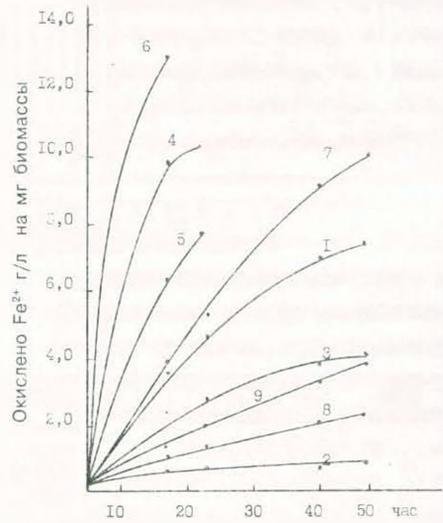


Рис. 2. Окисление Fe^{2+} шт.41, 69 и 86: 1, 2, 3 - в автотрофных условиях; 4, 5, 6 - в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта; 7, 8, 9 - в присутствии 0,2% глюкозы.

Влияние глюкозы на окисление S^0 в миксотрофных условиях изучалось при ее концентрации 0,1%. Из рис. 1 видно, что окисление серы в присутствии глюкозы подавляется у шт. 41, почти не меняется у шт.69 и стимулируется в 2,6 раза у шт. 86.

Окисление Fe^{2+} . Исследование показало, что все три штамма выделенных термоацидофильных бактерий способны расти литоавтотрофно, используя двухвалентное железо как источник энергии и CO_2 в качестве источника клеточного углерода. Однако добавление дрожжевого экстракта стимулирует окисление Fe^{2+} (рис.2). Так, в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта количество окисленного Fe^{2+} /мг биомассы за 17 ч увеличивается в 2,7; 5,6; 10,6 раз у шт. 41, 69 и 86 соответственно. При этом, как видно из рисунка, высокой активностью в отношении окисления Fe^{2+} в миксотрофных условиях вновь выделяется шт. 86.

Интересные данные получены при росте бактерий на среде с Fe^{2+} в миксотрофных условиях в присутствии 0,2% глюкозы. Показано, что в этих условиях удельная железоокисляющая активность подавляется у шт. 86 на 14,2%, а у шт. 69 и 41 она стимулируется на 18,2 и 30,5%

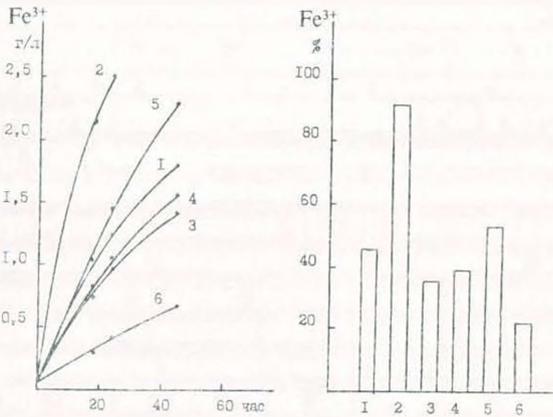


Рис. 3. Динамика окисления Fe²⁺ шт. 69: 1 - в автотрофных условиях; 2 - в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта и глюкозы в концентрации 3 - 0,05 %, 4 - 0,1 %, 5 - 0,2 %, 6 - 0,5 %

против 45,9% в условиях автотрофного роста. В присутствии 0,2% глюкозы наблюдается стимулирование окисления Fe²⁺ до 53,1%, которое к 45 ч культивирования бактерий достигает 83,7%, в то время как в отсутствие органических добавок этот показатель не превышает 62%.

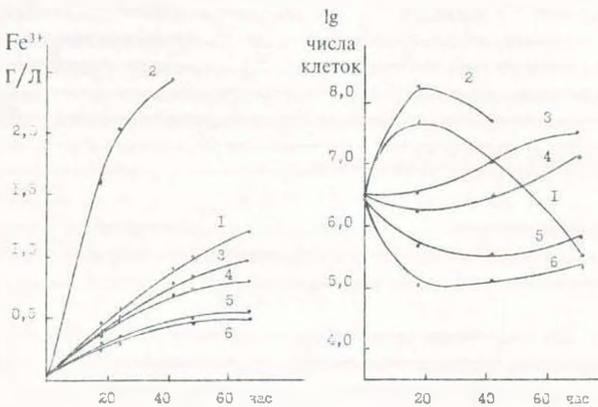


Рис. 4. Окислению Fe²⁺ старой (5-дневной) культурой шт. 69: 1 - в автотрофных условиях; 2 - в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта при содержании глюкозы в концентрации 3 - 0,05 %, 4 - 0,1 %, 5 - 0,2 %, 6 - 0,5 %.

При использовании более старой (5-дневной) культуры шт.69 в качестве посевного материала глюкоза в концентрациях от 0,05 до 0,5% ингибировала окисление Fe²⁺ и рост бактерий (рис. 4). По-видимому, с возрастом бактериальные клетки теряют способность к использованию экзогенного источника углерода - глюкозу. Это может быть связано и с тем, что кислородные соединения Fe³⁺ (ярозиты), сорбируясь на поверхности бактериальных клеток, затрудняют процесс диффузии питательных веществ в клетку. Отрицательное влияние ярозитов на жизнедеятельность бактерий было отмечено при бактериальном выщелачивании медьсодержащих сульфидных руд бактериями *Thiobacillus ferrooxidans* [12].

соответственно (рис. 2).

На рис. 3 представлена динамика окисления Fe²⁺ шт. 69 в миксотрофных условиях в присутствии разных концентраций глюкозы. Видно, что при низких концентрациях глюкоза задерживает окисление Fe²⁺. Так, за 24 ч количество окисленного Fe²⁺ составляет 35,7 и 38,8% при содержании в среде соответственно 0,05 и 0,1% глюкозы

и 0,1% глюкозы

При этом анализ

питательной среды в конце опыта заметных изменений в концентрации глюкозы в вариантах с 0,05 и 0,1% ее содержания не выявил. Однако в присутствии 0,02 мг/мл (0,2%) глюкозы через 48 ч культивирования бактерий ее содержание в среде составляет всего 0,016 мг/мл.

Следует отметить,

что влияние глюкозы на окисление Fe²⁺ зависит также от возраста

ионокулята. При использовании более старой (5-дневной) культуры шт.69 в качестве посевного материала глюкоза в концентрациях от 0,05 до 0,5% ингибировала окисление Fe²⁺ и рост бактерий (рис. 4). По-видимому, с возрастом бактериальные клетки теряют способность к использованию экзогенного источника углерода - глюкозу. Это может быть связано и с тем, что кислородные соединения Fe³⁺ (ярозиты), сорбируясь на поверхности бактериальных клеток, затрудняют процесс диффузии питательных веществ в клетку. Отрицательное влияние ярозитов на жизнедеятельность бактерий было отмечено при бактериальном выщелачивании медьсодержащих сульфидных руд бактериями *Thiobacillus ferrooxidans* [12].

Глюкоза вызывает также некоторое ускорение окисления Fe^{2+} у шт. 86 при росте в миксотрофных условиях. За 42 ч культивирования этих бактерий окислялось 28% внесенного в среду Fe^{2+} при автотрофном росте и 34,5 и по 33,6% в присутствии 0,05; 0,1 и 0,2% глюкозы соответственно. При содержании в среде 0,5% глюкозы рост бактерий и окисление Fe^{2+} подавляются (рис. 5)

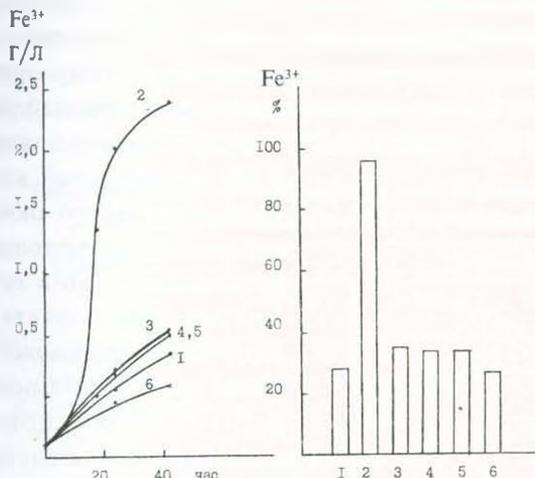


Рис. 5. Окисление Fe^{2+} шт. 86: 1 - в автотрофных условиях; 2 - в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта в присутствии глюкозы в концентрации: 3 - 0,05 %, 4 - 0,1 %, 5 - 0,2 %, 6 - 0,5 %.

вызывает некоторое ускорение его в случае со шт. 69.

Влияние аминокислот. Аланин в концентрации 0,1% почти не действовал на окисление Fe^{2+} шт. 86 при миксотрофном росте, а при культивировании шт. 69 в присутствии этой кислоты наблюдалось некоторое увеличение количества окисленного Fe^{2+} по сравнению с таковым в

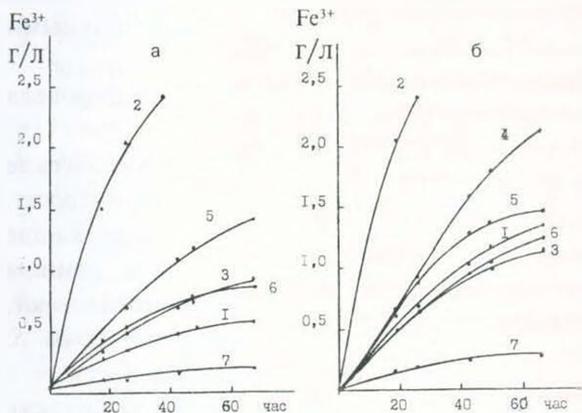


Рис. 6. Влияние витаминов и аминокислот на окисление Fe^{2+} шт. 69 (а) и шт. 86 (б): 1 - в автотрофных условиях; 2 - в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта при содержании в среде: 3 - смеси витаминов, 4 - 0,1 % глутаминовой кислоты, 5 - 0,2 % глутаминовой кислоты, 6 - 0,1 % аланина, 7 - 0,1 % пировиноградной кислоты.

условиях автотрофного роста (рис. 6). Однако при этом, по данным тонкослойной хроматографии, заметного уменьшения количества аланина в среде не зафиксировано. Следовательно, экзогенный аланин или вовсе не усваивается выделенными штаммами или усваивается очень слабо.

Глутаминовая кислота вызывает стимуляцию окисления Fe^{2+} обоими штаммами (рис.6). За 43 ч

культивирования в присутствии в среде 0,1% глутаминовой кислоты шт.69 окислено 1,09 г/л Fe^{2+} против 0,47 г/л при автотрофном росте и 1,57 г/л Fe^{2+} шт.86 против 1,04 г/л в автотрофных условиях. Однако при содержании в среде 0,2% глутаминовой кислоты количество окисленного шт. 86 Fe^{2+} значительно ниже и составляет лишь 1,3 г/л. Поэтому с целью выявления оптимальной концентрации глутаминовой кислоты окисление Fe^{2+} изучалось при ее содержании в среде от 0,02 до 0,1 %. Как видно из рис. 7, глутаминовая кислота во всех изученных концентрациях стимулирует окисление Fe^{2+} и рост шт. 86. Однако оптимальной концентрацией для роста бактерий и окисления Fe^{2+} является 0,05%. При внесении в среду

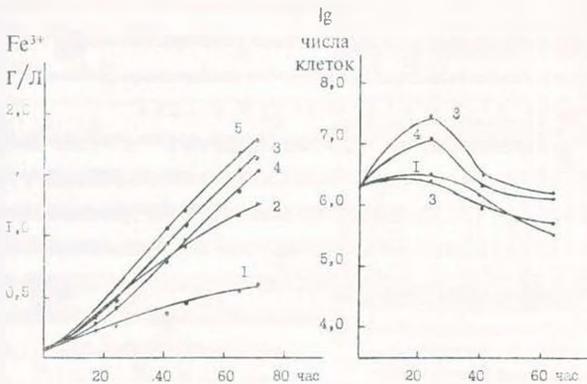


Рис. 7. Окисление Fe^{2+} шт. 86: 1 - в автотрофных условиях в присутствии глутаминовой кислоты в концентрации 2 - 0,02 %, 3 - 0,05 %, 4 - 0,1 %, 5 - 0,1 % + смесь витаминов.

0,1% глутаминовой кислоты количество окисленного железа не только не возрастает, но и несколько уменьшается. При совместном присутствии в среде витаминов и 0,1% глутаминовой кислоты наблюдается заметное улучшение обоих показателей.

По данным тонкослойной хроматографии, количество глутаминовой кислоты в среде уменьшается в той или иной степени в зависимости от ее первоначальной концентрации, внесенной в среду при миксотрофном росте. Очевидно, что она используется бактериями при миксотрофном росте на среде с Fe^{2+} . В ряде работ показано, что внесенный в среду углерод в виде органического субстрата может частично потребляться умеренно термофильными бактериями в процессе миксотрофного роста [13, 14].

Пировиноградная кислота в концентрации 0,1% ингибировала окисление Fe^{2+} шт. 69 и 86 (рис. 6).

Далее изучалась способность штаммов использовать органические вещества в качестве источника энергии, т.е. к хемоорганотрофному росту. С этой целью выделенные штаммы были высеяны на среды, содержащие по 0,1% дрожжевого экстракта, глюкозы, глутаминовой кислоты, аланина и пировиноградной кислоты. Приведенные в табл. 1 данные показывают, что ни один из этих штаммов, включая также типовой штамм *S. thermosulfidooxidans* шт. 41, не способны расти гетеротрофно на среде с глюкозой. В средах с L- α -аланином, L-глутаминовой кислотой, а также с дрожжевым экстрактом штаммы проявляют слабый рост, который полностью прекращается при 2 и 3 пассажах. В отличие от выделенных штаммов типовой штамм *S. thermosulfidooxidans* ВКМ В-1269 дает хороший рост на среде, содержащей в качестве единственного источника энергии

глутаминовую кислоту и дрожжевой экстракт.

Таким образом, изученные шт. 69 и 86, а также аспорогенный подвид *S. thermosulfidooxidans* шт. 41 не способны к хемоорганотрофному росту за счет окисления органических веществ, таких, как глюкоза, дрожжевой экстракт, глутаминовая кислота, аланин, пировиноградная кислота. Причиной этого может быть отсутствие эффективных путей катаболизма (полного окисления) органических соединений. Так, при изучении метаболизма углерода у *S. thermosulfidooxidans* ВКМ В-1269 установлены отсутствие глиоксилатного шунта и ограниченная возможность действия цикла трикарбоновых кислот [6].

Таблица 1. Хемоорганотрофный рост *S. thermosulfidooxidans* ВКМ В - 1269, *S. thermosulfidooxidans* шт.41 и изучаемых штаммов 69 и 86 (рН 3.0)

Штаммы	Оптическая плотность				
	Л-α-ала	Л-глу	ПВК	Дрожжевой экстракт	Глюкоза
<i>S. thermosulfidooxidans</i> ВКМ В-1269	0,01	0,13	0,005	0,13	0,03
<i>S. thermosulfidooxidans</i> шт.41	0,025	0,03	0,005	0,032	0,025
шт.69	0,020	0,022	0,005	0,04	0,025
шт.86	0,025	0,022	0,002	0,02	0,02

Что касается стимулирования роста бактерий и окисления Fe^{2+} в присутствии вышеуказанных органических веществ, то это можно объяснить их возможным использованием в конструктивном обмене в качестве дополнительного к углекислоте источника углерода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вартанян Н.С. Биолог. журн. Армении, 49, 1-2, 43-46, 1996.
2. Вартанян Н.С., Каравайко Г.И., Пивоварова Т.А. Микробиология, 59, 3, 411-417, 1990.
3. Вартанян Н.С., Пивоварова Т.А., Цаплина И.А., Каравайко Г.И. Микробиология, 57, 2, 268-274, 1988.
4. Герхардт Ф. и др. Методы общей бактериологии, М., Мир, 1983.
5. Головачева Р.С., Каравайко Г.И. Микробиология, 47, 5, 815-822, 1978.
6. Захарчук Л.М., Цаплина И.А., Красильникова Е.Н., Богданова Т.И., Каравайко Г.И. Микробиология, 63, 4, 573-580, 1994.
7. Красильникова Е.Н., Богданова Т.И., Захарчук Л.М., Цаплина И.А., Каравайко Г.И. Микробиология, 67, 2, 156-164, 1998.
8. Меламуд В.С., Пивоварова Т.А. Микробиология, 34, 3, 309-315, 1998
9. Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод. М., Недра, 1970.
10. Цаплина И.А., Богданова Т.И., Саякин Д.Д., Каравайко Г.И. Микробиология, 60, 6, 34-40, 1991.
11. Dodgson R.S. Biochem. J., 78, 312-319, 1961.
12. Porro S., Boiardi J.L., Tedesco P.H. Rev. Metal, 24, 5, 297-302, 1988.
13. Somogyi M. J. Biol. Chem., 195, 1, 19-22, 1952.
14. Wood A.P., Kelly D.P. FEMS Microbiol. Lett., 20, 107-,1983.

Поступила 27.V.1999