

Биолог. журн. Армении, 1-2 (57), 2005

УДК 579.834.017.73

ФАКУЛЬТАТИВНО АВТОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ *LEPTOSPIRILLUM* *SP.* ИЗ СУЛЬФИДНЫХ МЕСТОРОЖДЕНИЙ АРМЕНИИ

Н.С. ВАРДАНЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Из Анкаванского медно-молибденового месторождения Армении выделена новая железоокисляющая бактерия, относящаяся к роду *Leptospirillum*. Оптимальная температура роста бактерии 35°, оптимальное значение pH 2,3. Бактерия является факультативным автотрофом. Максимальную скорость роста и окисления Fe²⁺ и пирита проявляет в присутствии в среде 0,005-0,01% дрожжевого экстракта. Активность бактерии в окислении пирита в автотрофных условиях увеличивается при совместном выращивании с гетеротрофными ацидофилами.

Հայաստանի Հանքավանի պղինձ-մոլիբդենային հանքավայրի թթու հանքահոսքաջրերից մեկուսացվել է *Leptospirillum* ցեղին պատկանող նոր երկաթ օքսիդացնող բակտերիա: Բակտերիայի աճի օպտիմալ ջերմաստիճանը կազմում է 35°, օպտիմալ pH-ը՝ 2,3: Ֆակուլտատիվ ավտոտրոֆ է: Աճի և երկաթի ու պիրիտի օքսիդացման առավելագույն ակտիվություն է ցուցաբերում միջավայրում 0,005-0,01% խմորասնկային էքստրակտի առկայությամբ: Ցույց է տրվել, որ ավտոտրոֆ պայմաններում երկաթի և պիրիտի օքսիդացման արագությունը մեկուսացված շտամի մոտ զգալիորեն բարձրանում է ացիդոֆիլ հետերոտրոֆ բակտերիաների հետ համատեղ աճեցնելիս:

A new iron oxidizing bacteria belonging to the genus *Leptospirillum* has been isolated from acid drainage water of Hankavan copper-molibdenous ores of Armenia. Optimal growth of bacteria occurs at temperature 35° and pH 2,3. The bacteria shows maximum rate of growth and iron and pyrite oxidation in the presence of 0,005-0,01% yeast extract. It has been shown that activity of bacteria in oxidation of pyrite under autotrophic conditions significantly increases in mixed cultures with acidophilic heterotrophs.

Лептоспириллы - факультативный автотроф - выщелачивание пирита

В процесс биовыщелачивания минералов вовлечен консорциум ацидофильных железо- и/или сероокисляющих бактерий [14]. Среди них особенно важной и наиболее изученной является *Acidithiobacillus ferrooxidans*, и существующие технологии биовыщелачивания основаны главным образом на использовании этой бактерии [4]. Несмотря на то что *A. ferrooxidans* считается ведущим в биоокислительных процессах, недавно было установлено, что доминирующими железоокисляющими бактериями в промышленных установках непрерывного биовыщелачивания являются лептоспириллы. Причиной тому могут быть некоторые физиологические особенности лептоспирилл, в частности, более высокая устойчивость к низким значениям pH среды, повышенным температурам и высоким концентрациям Fe²⁺ [11, 13]. В связи с вышесказанным предполагается, что лептоспириллы могут

быть перспективны для использования в процессах биовыщелачивания пиритсодержащих руд, а также для удаления пирита из угля [15].

По данным ряда авторов, в соответствующих условиях лептоспириллы количественно превалируют над *A. ferrooxidans* в природных ценозах [15, 16].

Первый представитель рода *Leptospirillum* - *Leptospirillum ferrooxidans* был выделен Маркосяном [5] из медных руд Армении. В настоящее время род *Leptospirillum* включает три вида: типовой вид *Leptospirillum ferrooxidans* шт. L-15(T), термофильный вид - *Leptospirillum thermoferrooxidans* шт. L-88(T) [3] и недавно изолированный третий вид - *Leptospirillum ferriphilum* [7].

Считают, что лептоспириллы являются строгими автотрофами. Энергию для своей жизнедеятельности получают в процессе окисления пирита и/или Fe^{2+} [5, 8, 3].

Нами из медно-молибденового месторождения Армении выделена новая железоокисляющая бактерия *Leptospirillum sp.*, функционирующая при температуре до 40°.

Целью наших исследований являлось изучение морфо-физиологических особенностей выделенных бактерий и оценка их активности в биоокислении пирита в монокультуре и в ассоциации с другими ацидофилами.

Материал и методика. Для изолирования бактерий *Leptospirillum sp.* среду Летена инокулировали пробами рудничных вод Анкаванского и Шамлугского месторождений Армении и инкубировали при 35°. Чистые культуры бактерий получали путем выделения отдельных колоний, выросших на той же среде, уплотненной с помощью агарозы (0,6%) (Sigma, Type I: Low EEO). Морфологию выделенных бактерий изучали на электронном микроскопе JEM-100. Тотальные препараты для электронной микроскопии контрастировали 1%-ным раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты. Биомассу бактерий определяли по содержанию белка методом Петерсона [12]. Определение количества жизнеспособных клеток проводили методом предельных десятикратных разведений [2]. Бактериальному выщелачиванию подвергали пирит Шамлугского месторождения Армении, содержащий Fe - 43,8% и S - 49,0%, и размером частиц - 100/+70мкм. Опыты по выщелачиванию проводили в колбах Эрленмейера в периодическом режиме культивирования на качалке (180 об/мин) при 37°. Об интенсивности окисления пирита судили по количеству ионов железа, перешедших в среду. Ионы Fe^{2+} и Fe^{3+} определяли комплексометрическим методом трилоном Б [6].

Результаты и обсуждение. Из отвалов руд Анкаванского медно-молибденового и Шамлугского медно-рудного месторождений Армении выделены два штамма бактерий *Leptospirillum sp.* шт.50 и шт.54.

Морфология. Выделенные бактерии *Leptospirillum sp.*, подобно *L. ferrooxidans*, проявляют полиморфизм. Клетки в логарифмической фазе на среде с Fe^{2+} представляют собой вибрионы размером 0,9-1,0 x 0,2-0,3мкм. По мере роста появляются спиральные формы, состоящие из 2-4 витков (рис.1). В стационарной фазе в культуре преобладают псевдококки, которые представляют не что иное, как вибрионы с плотно смыкающимися концами (рис.1г). Особенностью культуры, растущей на пирите, является отсутствие псевдококков и преобладание спиральных форм, количество витков которых может достигнуть 10.

Бактерии *Leptospirillum sp.* подвижны, благодаря одному полярному жгутику. Снаружи клетки покрыты слизистым слоем (рис.1б, в).

Размножаются делением надвое (рис.1б). У спиральных форм наблюдается неравномерное деление, когда отделяется один из витков или происходит септация - расщепление на отдельные вибрионы.

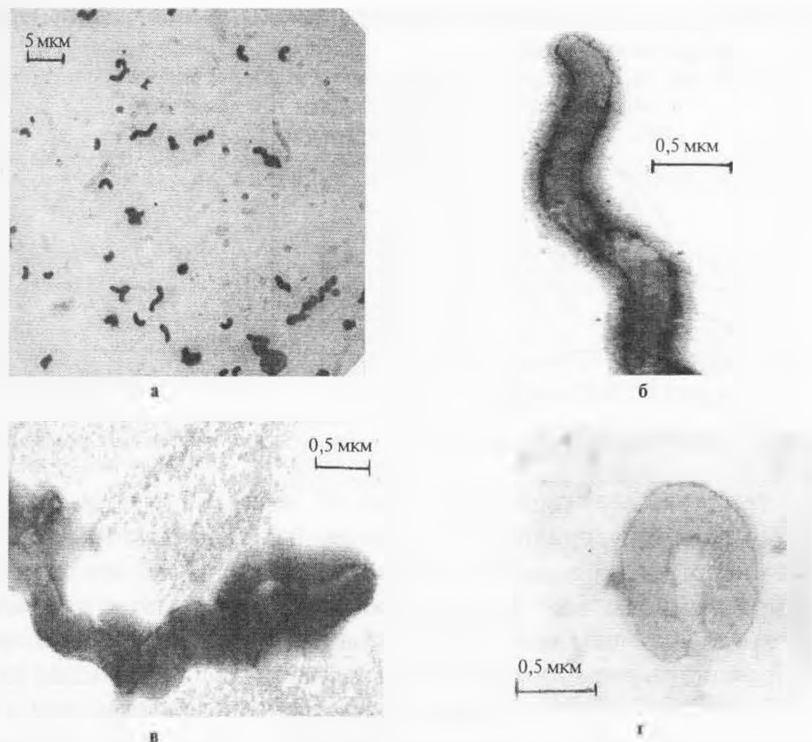


Рис. 1. Общий вид *Leptospirillum* sp. шт. 50. а) световой микроскоп, б-г) электронный микроскоп, а-в) в логарифмической фазе, г) в стационарной фазе.

Физиологические особенности. Оптимальная температура роста у выделенных штаммов составляла 35°. Нижний предел роста был 25°, верхний - 45°. Примечательно, что при 40° у штаммов сохранялась высокая окислительная активность, тогда как при 45° она резко снижалась. Окисление Fe^{2+} выделенными бактериями прекращалось при 50° (рис.2).

Рост бактерий шт. 50 на среде с Fe^{2+} имел место в интервале исходных значений pH 1,4 - 3,2. Оптимальное значение реакции среды составляло pH 2, 3 (рис.3).

Описанные нами ранее бактерии *Leptospirillum* sp. шт.64 и шт.72 являлись строгими автотрофами (рис.4) [1]. Дрожжевой экстракт в пределах концентраций 0,002-0,01% не оказывал существенного влияния и на рост шт.54, тогда как у шт.50 максимальное

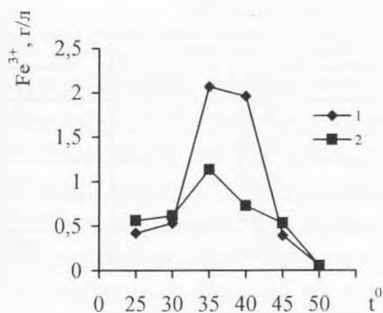


Рис.2. Окисление Fe^{2+} бактериями *Leptospirillum* sp. шт.50(1) и шт.54 (2) при различных температурах

количество окисленного Fe^{2+} (1,62г/л) наблюдалось при 0,005% дрожжевого экстракта (табл.1). С увеличением в среде концентрации дрожжевого экстракта до 0,02% наблюдалось увеличение биомассы, однако при этом уменьшалось количество окисленного железа до 1,04г/л. При содержании в среде дрожжевого экстракта в концентрации 0,05% и более окисление Fe^{2+} резко ингибировалось (табл.1).

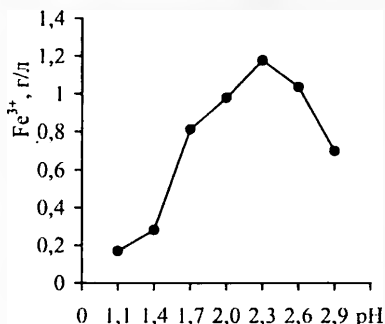


Рис. 3. Влияние pH на окисление Fe^{2+} *Leptospirillum* sp. шт.50.

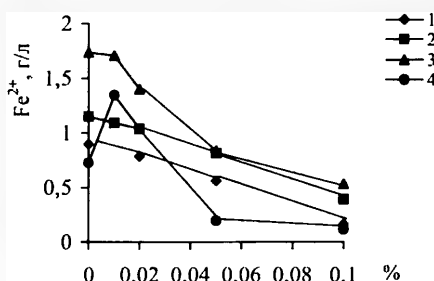


Рис. 4. Влияние концентраций дрожжевого экстракта на окисление Fe^{2+} *Leptospirillum* sp. шт. 64(1), шт.72 (2), 54(3) и 50 (4).

По-видимому, при низких концентрациях дрожжевого экстракта шт.50 растет миксотрофно, используя дрожжевой экстракт как дополнительный источник углерода, что обеспечивает прирост биомассы и приводит к увеличению количества окисленного бактериями Fe^{2+} . При более высоких концентрациях в среде дрожжевого экстракта бактерии полностью переходят к органотрофному росту, используя органические вещества как в качестве источника углерода, так и энергии. При этом резко подавляется железоокисляющая активность бактерий. В органотрофных условиях в присутствии только дрожжевого экстракта без неорганических источников энергии бактерии растут слабо.

Таблица 1. Влияние различных концентраций дрожжевого экстракта на рост *Leptospirillum* sp. шт.50 и шт.54 и окисление ими Fe^{2+} (время культивирования 4 сут., $t - 37^\circ$, $\text{Fe}^{2+} - 2,0$ г/л)

Концентрация дрожжевого экстракта, %	Количество окисленного Fe^{2+} , г/л		Белок, мг/л
	шт.54	шт.50	
0	0,98	0,728	0,005
0,005	1,092	1,624	0,0065
0,01	0,952	1,344	0,007
0,02	0,840	1,036	0,008
0,05	0,588	0,196	0,011
0,1	0,532	0,112	0,0085
0,2	0,448	0,084	0,007

Проведенные исследования показали, что выделенные бактерии *Leptospirillum* sp.шт.50 способны активно окислять пирит. Причем,

установлено, что окисление пирита шт.50 более активно протекает в присутствии дрожжевого экстракта. Так, за 10 дней культивирования бактерий выщелачивается 4,2 и 4,6 г/л Fe при автотрофном и миксотрофном росте соответственно (табл. 2, рис. 5). При этом по сравнению с автотрофным ростом значительно сокращается продолжительность лаг-фазы (рис. 5).

Таблица 2. Окисление пирита бактериями *Leptospirillum sp.* шт.50 и их ассоциацией с ацидофильными гетеротрофами (FeS₂ -2%, время культивирования 10 дней, t 37°)

Использованные штаммы	Выщелочено железо, г/л		pH, нач./конеч.	Eh, мв, нач./конеч.
	Fe ³⁺	Fe ²⁺		
Контроль	0,028	0,420	1,9/1,85	578/578
шт.50	4,200	0,028	1,9/1,43	578/820
шт.50*	4,568	0,028	1,9/1,4	578/860
шт.50 + шт.50-гет	5,852	0	1,9/1,3	578/870
шт.50 + шт.50-гет*	4,704	0,028	1,9/1,37	580/795

Примечание: * - культура была выращена в присутствии 0,01% дрожжевого экстракта.

Исследования показали, что окисление пирита шт.50 в автотрофных условиях примерно в 1,4 раза стимулируется при совместном выращивании с ацидофильным гетеротрофным шт.50-гет. При этом наблюдалась корреляция между количеством выщелоченного железа, значениями pH и окислительно-восстановительного потенциала среды (табл. 2). Активность смешанной культуры в присутствии 0,01% дрожжевого экстракта значительно ниже, что можно объяснить конкуренцией, возникающей между *Leptospirillum sp.* шт.50 и ацидофильной гетеротрофной бактерией за органические вещества.

Таким образом, выделенные бактерии *Leptospirillum sp.* способны получать энергию для жизнедеятельности как при окислении двухвалентного железа, так и пирита. Кроме того, они отличаются от *L. ferrooxidans* четко выраженной термотолерантностью, что позволяет вести процесс биовыщелачивания с их использованием при более высоких температурах со значительно высокой скоростью. *Leptospirillum*-подобные бактерии с аналогичными свойствами были обнаружены в технологических установках непрерывного выщелачивания пирита [7, 15]. Однако в отличие от всех описанных до настоящего времени представителей рода *Leptospirillum*, являющимися облигатными автотрофами [3, 5, 9, 10], выделенный

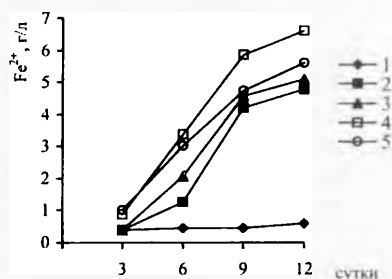


Рис. 5. Динамика окисления FeS₂ ассоциацией *Leptospirillum sp.* шт.50 и ацидофильных гетеротрофных бактерий. 1 - контроль, 2 - в автотрофных условиях, 3 - в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта, 4 - при совместном культивировании со шт.50гет, 5 - при совместном культивировании со шт.50гет в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта.

Leptospirillum sp. шт.50 является факультативным автотрофом и проявляет наибольшую скорость роста и окисления Fe^{2+} и пирита в присутствии 0,005-0,01% дрожжевого экстракта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Варданян Н.С., Акопян В.П. Микробиология. 72, 4, 1-5, 2003.
2. Герхардт Ф. и др., Методы общей бактериологии: в 3т., М., Мир, 1, 1983.
3. Головачева Р.С., Голышина О.В., Каравайко Г.И., Дорофеев А.Г., Пивоварова Т.А., Черных Н.А. Микробиология. 61, 6, 1056-1064, 1992.
4. Каравайко Г.И., Кузнецов С.И., Голомзик А.И. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. М.: Наука, 248с., 1972.
5. Маркосян Г.Е. Биолог. журн. Армении. 25, 2, 26-29.
6. Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод. М.: Недра, 1970.
7. Coram N. J., Rawlings D. E. Appl. Environ. Microbiology. 68, 2, 838-845, 2002.
8. Eccleston M., Kelly D.P., Wood A.P. Autotrophic Growth of *Leptospirillum ferrooxidans*. Planetary Ecology. Eds. by Caldwell D.E., Brierley J.A., Brierley C.L. - VNR Comp. Inc. NY. 253 - 262, 1985.
9. Harrison A.P., Norris P.R. FEMS Microbiol. Lett. 33, 99-102, 1985.
10. Hippe H. System. Evol. Microbiology. 50, 501-503, 2000.
11. Norris P.R., Barr D.W., Hinson D. Iron and mineral oxidation by acidophilic bacteria: affinities for iron and attachment to pyrite, P.R.Norris, D.P. Kelly (ed.), Biohydrometallurgy, Science and Technology Letters. - Kew, Surrey, U.K. 43-59, 1988.
12. Peterson G.L. Anal. Biochem. 3, 346-356, 1977.
13. Rawlings D.E., Tributsch H. Hansford G.S. Microbiology. 145, 5-13, 1999.
14. Rawlings D.E., Silver S. Mining with microbes. Bio/Technology. 13, 773-778, 1995.
15. Sand W., Rohde K., Sobotke B., Zenneck C. Microbiol. 58, 1, 85-92, 1992.
16. Schrenk M.O., Edwards K.J., Goodman R.M., Hemers R.J., Banfield J.F. Science. 279, 1519-1522, 1998.

Поступила 20.XII.2004