



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 ռԻԵՑ-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 PRIZM 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].

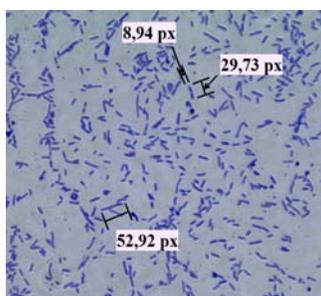


Рис. 1. Микрофотография окрашенных генциановым фиолетовым клеток шт. SO-1 (1пиксель (px) = 263,6 микрометр)

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).

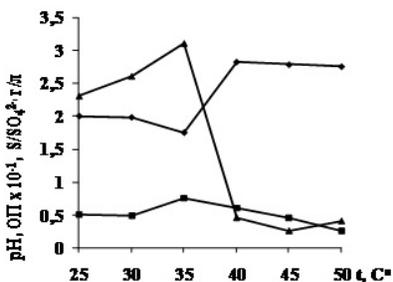


Рис. 2. Влияние температуры на рост бактерии шт. SO-1 и окисление элементарной серы (продолжительность – 9 сут.)
 ◆ - pH, ■ - оптическая плотность (ОП × 10⁻¹), ▲ - S/SO₄²⁻, г/л

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).

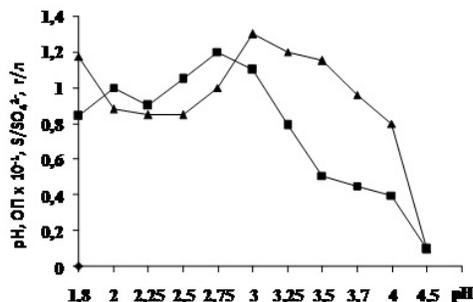


Рис. 3. Рост бактерии шт.SO-1 и окисление элементарной серы в зависимости от рН среды (продолжительность ■ сут.) - оптическая плотность (О▲ x 10⁻¹), - S/SO₄²⁻ г/л

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).

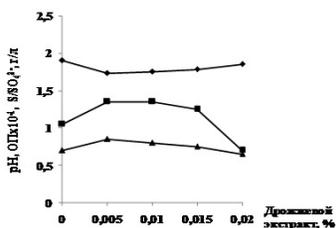


Рис. 4. Влияние концентрации дрожжевого экстракта на рост шт.SO-1 и окисление элементарной серы (продолжительность – 10 сут.)

◆ - рН, - оптическая плотность (О▲ 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

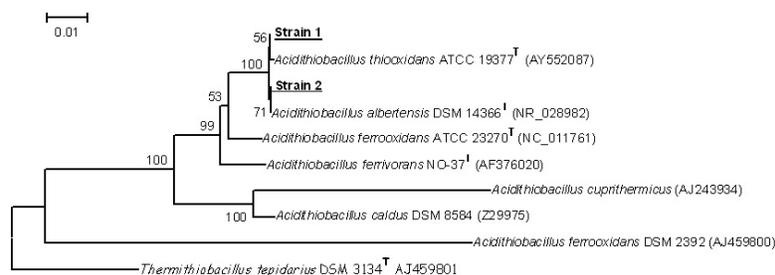


Рис. 5. Филогенетическое положение исследованных штаммов внутри рода *Acidithiobacillus*. Алгоритм построения дендрограммы – ‘neighbor-joining’ на основании сравнения 500 альтернативных деревьев. Слева сверху указан масштаб эволюционных расстояний. Достоверность ветвления указана в процентах. Указаны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