Федеральное государственное автономное

образовательное учреждение высшего образования

«Национальный исследовательский Томский государственный университет»

На правах рукописи

Анциферов Дмитрий Викторович

ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ КИСЛЫХ ШАХТНЫХ ОТХОДОВ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ОБРАЗОВАНИЯ СУЛЬФИДОВ МЕТАЛЛОВ

Специальность 03.02.03 – Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель доктор биологических наук, профессор Карначук О.В.

оглавление

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	10
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1.Современные представления о диссимиляционной сульфатредукции	13
1.2.Распространение СРБ в отходах добычи металлов и их использование	
для очистки	18
1.2.1.СРБ в окисленных отходах добычи металлов	
и механизмы защиты от окислительного стресса	19
1.2.2.Биотехнологии очистки отходов добычи металлов на основе СРБ	22
1.2.3. Использование ацидофильных и нейтрофильных СРБ в схемах	
очистки отходов добычи металлов	24
1.3.Ацидофильные СРБ – выделение и культивирование	27
1.4.Образование сульфидов металлов СРБ	30
1.4.1.Образование сульфидов железа под действием СРБ	31
1.4.2.Образование сульфидов металлов, отличных от железа, под	
действием СРБ	34
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1.Объекты исследования	35
2.1.1.Описание мест отбора проб	35
2.1.2.Использованные штаммы СРБ	38
2.2.Методы исследования	39
2.2.1.Отбор проб для выделения культур СРБ	39
2.2.2.Выделение и культивирование СРБ при периодическом	
культивировании	40
2.2.3.Определение пределов и оптимальных значений рН для роста	42
2.2.4.Культивирование в биореакторе	43

2.2.5.Определение устойчивости к металлам и получение биогенных	
осадков	44
2.2.6.Микроскопические методы	45
2.2.7.Молекулярно-биологические методы	46
2.2.8.Филогенетический анализ	48
2.2.9.Аналитические методы исследования	48
2.2.10. Статистическая обработка данных	54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	
3.1. Физико-химическая характеристика проб отходов добычи металлов	55
3.2.Получение накопительных и чистых культур СРБ	58
3.3.Получение чистых культур путем создания градиента pH в биореакторе	64
3.4.Особенности физиологии и анализ генома ацидофильных и	
ацидотолерантных изолятов СРБ	70
3.4.1.Рост при различных pH	71
3.4.2.Потребление кислорода и механизмы защиты	73
3.4.3.Анализ генома Desulfovibrio sp. DV	78
3.5.Устойчивость к металлам и образование сульфидов кобальта (II)	
штаммами СРБ при периодическом культивировании	85
3.5.1. Устойчивость к металлам	85
3.5.2. Образование сульфидов кобальта	87
3.6.Культивирование ацидофильных СРБ и образование сульфидов	
металлов при непрерывном культивировании	92
3.6.1.Культивирование ацидофильных СРБ при непрерывном	
режиме	93
3.6.2.Получение сульфидов металлов в биореакторе с проточным	
режимом культивирования	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	109
ВЫВОДЫ	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	112

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АМР – аденозинмонофосфат;

- Арг аденозинфосфосульфат редуктаза;
- APS аденозинфосфосульфат;
- at% атомные проценты;
- АТР аденозинтрифосфат;
- Dsr диссимиляционная сульфитредуктаза;
- ICP-MS масспектральный анализ с индуктивно связанной плазмой;
- NADH восстановленный никотинамидадениндинуклеотид;
- РРі пирофосфат;
- Sat АТР-сульфурилаза;
- SEM сканирующая электронная микроскопия;
- ТЕМЕD тетраметилэтилендиамид;
- XRD рентгенофазовый анализ;
- ГОК горно-обогатительный комбинат;
- ДГГЭ денатурирующий градиентный гель-электрофорез;
- ДНК дезоксирибонуклеиновая кислота;
- КШД кислый шахтный дренаж;
- ОВП окислительно-восстановительный потенциал;
- п.н. пар нуклеотидов;
- ПЦР полимеразная цепная реакция;

ПЦР-ДГГЭ – разделение амплифицированных фрагментов ДНК в денатурирующих условиях;

СРБ – сульфатредуцирующие бактерии;

ТАЕ-буфер – трис-ацетатный электродный буфер;

ТЕМ - трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия;

ЭДС (EDS) – энергодисперсионный анализ;

введение

Актуальность Образование сульфидов темы. металлов сульфатредуцирующими бактериями (СРБ) - известный биогеохимический процесс. В его основе лежит химизм диссимиляционной сульфатредукции. сульфата, Конечный продукт восстановления высокореакционный H_2S , связывает металлы в сульфиды с низкой растворимостью. Этот процесс биоминерализации используется для очистки содержащих металлы стоков как путем создания искусственных ветландов, так и осаждением в биореакторах (Rabus et al., 2015;-Карначук и др., 2015). К штаммам СРБ, используемым в биотехнологиях осаждения, предъявляется ряд требований, основными из которых являются устойчивость к высоким концентрациям ионов металлов и низким рН. Отходы добычи и переработки металлов в большинстве случаев характеризуются кислыми условиями из-за протон-генерирующего процесса окисления остаточных сульфидов кислородом воздуха. Несмотря на многочисленные свидетельства протекания процесса сульфатредукции в Koschorreck, 2008), местообитаниях (обзор выделение кислых ацидофильных/ацидотолерантных СРБ до сих пор не имело большого успеха. К литературе описаны единичные настоящему времени В мезофильные ацидофильные/ацидотолерантные сульфатредукторы, главным образом, представители рода Desulfosporosinus (Alazard et al., 2010; Sánchez-Andrea et al., 2014). СРБ, относящиеся к роду Desulfovibrio, имеют ряд преимуществ для создания биотехнологий. К ним относятся: быстрый рост, широкий спектр субстратов, устойчивость к кислороду. Однако к настоящему времени выделен лишь один ацидотолерантный представитель Desulfovibrio (Karnachuk et al., 2015). Ни один из описанных к настоящему времени ацидофильных СРБ не является устойчивым к высоким концентрациям ионов металлов. Исследования устойчивости к металлам у ацидофильных микроорганизмов ведутся активно, однако большинство исследований касается ограниченной группы серу-металлокисляющих прокариот (Orell et al., 2010, 2013; Navarro et al., 2013). Об устойчивости ацидотолерантных СРБ информации в литературе мало.

Важной характеристикой биогенных сульфидов металлов является их минералогический состав. Для биогеотехнологических процессов очистки стоков от металлов тип кристаллизации имеет второстепенное значение. Однако минералогическая твердой фазы характеристика является определяющим фактором при целенаправленном получении наноразмерных и наноструктурированных сульфидов металлов. В частности, сульфид меди Cu₂S является важным полупроводником р-типа и имеет большой потенциал в качестве катодного материала для литий-ионных аккумуляторов, абсорбентов для солнечных батарей и нелинейных оптических материалов (Lai et al., 2012). Наноразмерные ориентированные сульфиды кобальта (Со₉S₈) - важные катализаторы гидрообессеривания нефти. В настоящее время наноразмерные кристаллические сульфиды металлов получают с использованием реакций, проходящих при высоком давлении, температурах и с использованием токсичных соединений. В промышленности существует запрос на создание безопасных и недорогих методов «зеленой химии». Биоминерализация с использованием СРБ может представлять такой путь.

Таким образом, актуальность исследования определяется необходимостью выделения новых штаммов и консорциумов ацидофильных/ацидотолерантных СРБ и изучения их взаимодействия с металлами. Устойчивые к металлам ацидофильные СРБ могут быть использованы для разработки биотехнологий очистки кислых шахтных отходов, а также в качестве штаммов-продуцентов сульфидов кристаллических наноструктурированных металлов. Для И выделения устойчивых форм СРБ могут быть использованы новые подходы, преодоление ограничений направленные на традиционных методов культивирования. Культивирование в биореакторе позволяет контролировать доминирование ацидофильных форм путем изменения параметров среды, и быть может использовано накопления ДЛЯ И выделения ацидофильных/ацидотолерантных СРБ. Непрерывное культивирование

6

сульфидогенов и изучение процессов образования биогенных сульфидов металлов в условиях биореактора необходимо для разработки пилотных установок для промышленного производства.

Цель и задачи исследования. Целью исследования являлось выделение новых СРБ, устойчивых к металлам и низким pH и изучение образования ими сульфидов металлов для разработки основ биотехнологии получения биогенных кристаллов сульфидов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- Получить накопительные культуры и выделить новые ацидофильные/ацидотолерантные изоляты СРБ из отходов добычи полиметаллических руд в Забайкальском крае.
- 2. Разработать и использовать новые подходы для выделениях чистых культур ацидофильных/ацидотолерантных представителей рода *Desulfovibrio*.
- Определить последовательность генома (драфт) для одного из ацидофильных/ацидотолерантных изолятов СРБ и провести поиск механизмов устойчивости к металлам и низким значениям pH в геноме.
- 4. Изучить устойчивость к ионам кобальта и других металлов у новых изолятов СРБ и исследовать образование ими кристаллических фаз сульфидов кобальта (II) при периодическом культивировании.
- Изучить возможность образования кристаллических сульфидов меди и кобальта при непрерывном культивировании ацидофильных СРБ в биореакторе.

Научная новизна работы. Выделены ацидофильные новые И ацидотолерантные СРБ, относящихся к родам *Desulfovibrio* (Deltaproteobacteria) (Firmicutes). Desulfosporosinus Чистые И культуры ацидотолерантных Desulfovibrio были выделены с использованием нового подхода, основанного на биореакторе, создании временного градиента pН В совмещенного С молекулярным мониторингом изменений в сообществе микроорганизмов. Впервые ацидофильный представитель рода *Desulfosporosinus* был успешно

7

культивирован в непрерывном режиме путем создания бинарной культуры с ацидотолерантным *Desulfovibrio*. Впервые показана биоминерализация микрои макрокристаллов сульфидов кобальта чистыми культурами микроорганизмов. Впервые продемонстрирована возможность образования биогенных ярровита (Cu₉S₈) и линнеита (Co₃S₄) микроорганизмами.

Практическая значимость работы. Ацидофильные и ацидотолерантные штаммы СРБ, выделенные и охарактеризованные при выполнении работы, являются потенциальными продуцентами сульфидов металлов, которые могут найти применение при создании биотехнологий. Процессы, основанные на штаммах СРБ, могут быть использованы в промышленности, добывающей и перерабатывающей Данные металлы. ПО культивированию штаммовпродуцентов в биореакторе и в условиях периодической культуры в совокупности с физико-химической характеристикой образованных осадков являются заделом для создания биотехнологических схем по получению сульфидов меди и кобальта с использованием чистых и смешанных культур СРБ. Результаты экспериментов по получению осадков сульфидов металлов разного минералогического состава путем варьирования условий культивирования могут лечь в основу разработки метода целенаправленного дизайна кристаллических сульфидов металлов в промышленных целях.

Личный вклад соискателя. Автором выделены чистые культуры СРБ, выполнены все эксперименты по изучению роста СРБ в биореакторе, получены сульфиды металлов при непрерывном и периодическом культивировании СРБ. штаммов на основе данных энергодисперсионного анализа охарактеризован элементный состав осадков. Расшифровка данных дифракционного анализа выполнена совместно с О.П. Иккерт. Отдельные этапы выделения штаммов Desulfovibrio spp. и Desulfosporosinus sp. NP и их характеристики выполнены при участии сотрудников Лаборатории биохимии и молекулярной биологии при Кафедре физиологии растений и биотехнологии ТГУ. Эксперименты по изучению устойчивости СРБ к кислороду и механизмов защиты выполнены автором совместно с д-ром Гелем Брассйером.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на 11-м международном конгрессе «Extremophiles-2016» (Киото, Япония, 2016 г.), Х молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, Россия, 2015 г.), Всероссийской молодежной научной конференции с международным участием «Биотехнология, биоинформатика и геномика растений и микроорганизмов» (Томск, Россия, 2016 г.), V Съезде биохимиков России (Сочи-Дагомыс, Россия, 2016 г.).

Финансовая поддержка. Исследования поддержаны грантом Министерства науки и образования РФ в рамках Федеральной Целевой Программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям комплекса России 2014-2020 развития научно-технического на годы» (приоритетное направление «Живые системы»), соглашение № 14.575.21.0067. Изучение устойчивости штаммов-продуцентов к кислороду поддержаны РФФИ 16-54-150011. Работы по образованию наноразмерных грантом сульфидов кобальта поддержаны грантом РНФ № 14-14-00427.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов и их обсуждения, заключения и выводов, списка использованных источников. Список литературы включает 218 источников. Материалы диссертации представлены на 135 листах и содержат 39 рисунков и 7 таблиц.

Место проведения работы. Работа выполнена в Лаборатории биохимии и молекулярной биологии при Кафедре физиологии растений и биотехнологии Биологического института Томского государственного университета. Определение последовательности генома было проведено группой проф. Н.В. Равина в ФИЦ Биотехнологии РАН (Москва). Эксперименты по исследованию устойчивости к кислороду проведены в Лаборатории химии бактерий

Института микробиологии Средиземноморья Национального Исследовательского Центра Франции, CNRS (Марсель, Франция).

Благодарности. Автор признателен коллегам, в соавторстве с которыми были проведены эксперименты, М.Р. Авакяну, Г. Брассейру, П.А. Бухтияровой, А.Л. Герасимчук, Д.А. Ивасенко, О.П. Иккерт, Е.А. Латыголец, А.П. Лукиной, А.А. Ковалевой, Т.С. Федоровой и Ю.А. Франк. Благодарю Н.В. Равина и сотрудников его группы в ФИЦ Биотехнологии РАН В.В. Кадникова и А.В. Марданова за секвенирование генома. Дэвида Бэнкса за помощь в проведении химического анализа проб. Особую благодарность автор выражает научному руководителю О.В. Карначук за неоценимую помощь в работе, обсуждении результатов и написании диссертации.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ Экспериментальные статьи

- Antsiferov D.V., Fyodorova T.S., Kovalyova A.A., Lukina A., Frank Y.A., Avakyan M.R., Banks D., Tuovinen O.H., Karnachuk O.V. (2017) Selection for novel, acid-tolerant *Desulfovibrio* spp. from a closed Transbaikal mine site in a temporal pH-gradient bioreactor. Antonie van Leeuwenhoek. doi:10.1007/s10482-017-0917-4.
- Kovaliova A.A., Kadnikov V.V., Antsiferov D.V., Beletsky A.V., Danilova E.V., Avakyan M.R., Mardanov A.V., Karnachuk O.V. (2017) Genome sequence of the acid-tolerant *Desulfovibrio* sp. DV isolated from the sediments of a Pb-Zn mine tailings dam in the Chita region, Russia. Genomics Data. V. 11. P. 125–127. doi: 10.1016/j.gdata.2017.01.007.
- Mardanov A.V., Panova I.A., Beletsky A.V., Avakyan M.R., Kadnikov V.V., Antsiferov D.V., Banks D., Frank Y.A., Pimenov N.V., Ravin N.V., Karnachuk O.V. (2016) Genomic insights into a new acidophilic, copper-resistant *Desulfosporosinus* isolate from the oxidized tailings area of an

abandoned gold mine. FEMS Microbiology Ecology. V. 9 (8)2. fiw111. doi: 10.1093/femsec/fiw111.

 Frank Y.A., Banks D., Avakyan M.R., Antsiferov D.V., Kadychagov P.B. and Karnachuk O.V. (2016) Firmicutes is an important component of microbial communities in water-injected and pristine oil reservoirs; Western Siberia, Russia. Geomicrobiology J. V. 33(5). P. 387-400. http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01490451.2015.1045635.

Тезисы конференций

- Karnachuk O., Ikkert O., Antsiferov D., Fyodorova T., Panova I., Kovalyova A., Bushuieva M., Zakharova A., Ravin N., Tuovinen O.H. Novel acidophilic, metal-tolerant sulfate-reducing bacteria can produce nano-size transition metal sulfides. Extremophiles 2016. Book of Abstracts. 11th International Congress on Extremophiles. September 12-16, Kyoto, Japan. P. 330.
- 2. Анциферов Д.В., Федорова Т.С., Латыголец Е.А., Герасимчук А.Л., Карначук O.B. Ковалева A.A.. Ивасенко Д.А., Выделение ацидотолерантных Desulfovibrio с помощью культивирования В биореакторе. Материалы Х молодежной школы-конференции С «Актуальные современной международным участием аспекты микробиологии». М., 2015. С.11-13.
- 3. Латыголец Е.А., Анциферов Д.В., Ивасенко Д.А., Федорова Т.С., Карначук О.В. Культивирование бинарной культуры сульфатредуцирующих бактерий в биореакторе. Биотехнология, биоинформатика и геномика растений и микроорганизмов. Материалы Всероссийской молодежной научной конференции с международным участием. 26-28 апреля 2016 г. Томск: Издательский дом ТГУ. с. 113-117.
- Бухтиярова П.А., Анциферов Д.В., Брассер Г., Дола А., Карначук О.В. Устойчивость к кислороду у сульфатредуцирующих бактерий, перспективных для осаждения металлов. Научные труды V Съезда

физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM. Сочи-Дагомыс 04- 09 октября 2016 г. Аста Naturae. Т. 2. С. 239.

 Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Frank Y.A., Antsiferov D.V., Karnachuk O.V., Ravin N.V. Desulforudis audaxviator inhabiting the gold mine in South Africa thrives in a deep subsurface aquifer in Siberia. Thermophiles 2017. Book of Abstracts. 14th International meeting on thermophile biology. August 27 - September 1, Mpumalanga, South Africa, № OL10.3.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления о диссимиляционной сульфатредукции

Сера является одним из основных элементов, входящих в состав живых клеток. Соединения железа и серы, образованные в результате геохимических процессов на ранних этапах развития Земли, рассматриваются как катализаторы возникновения жизни (Wächtershäuser, 2010). Восстановление сульфата, равно как и восстановление элементарной серы, рассматривают как древние метаболические процессы (Canfield and Raiswell, 1999).

Ha сегодняшний большое лень известно количество видов большинство сульфатредуцирующих микроорганизмов, однако ИЗ них расположены в нескольких филогенетических линиях, которые, в свою очередь, относятся к домену бактерии. Изветные СРБ принадлежат к классам Deltaproteobacteria, Negativicutes, Clostridia, Thermodesulfobacteria и Nitrospira (Rabus et al., 2015). Несмотря на то, что продолжают появляться сообщения об описании новых представителей СРБ, сульфатвосстанавливающие прокариоты располагаются на дереве жизни ближе к его основанию, что указывает на раннюю дивергенцию от общего предка. Предполагается, что сульфатное дыхание возникло 3.4 млрд лет назад (Shen et al., 2001; Wagner et al., 1998). Распределение сульфатредукторов по разным таксономическим группам бактерий и в домене Archaea объясняется низким содержанием сульфата в водах мирового океана около 2.4 млрд лет назад (Canfield, 2005).

Механизм диссимиляционной сульфатредукции изучался, в основном, на представителях рода *Desulfovibrio*. Это связано с тем, что они легко поддаются культивированию и имеют высокую скорость роста по сравнению с другими СРБ (Rabus et al., 2006; Ollivier et al., 2007; Barton and Fauque, 2009; Keller et al., 2011). Диссимиляционное восстановление сульфата до сульфида водорода - это внутриклеточный процесс, при котором для восстановления одного аниона

сульфата вовлекается восемь электронов, в качестве интермедиата выступает бисульфит (рис.1).



Рис. 1. Общая схема диссимиляционной сульфатредукции (адаптировано из Fauque and Barton, 2012).

Транспорт сульфат-иона в клетку осуществляется посредством симпорта через вторичную систему однонаправленного транспорта совместно с катионами натрия или протонами (Cypionka, 1995). Для СРБ описаны два типа транспортных систем, активность которых зависит от концентрации сульфата в среде. При низком содержании сульфата активируется транспортная система, осуществляющая симпорт аниона сульфата и трех одновалентных катионов. При содержании сульфата функционирует высоком конститутивная однонаправленная транспортная система (Cypionka, 1995). Наличие двух типов транспортных систем коррелирует с высоким и низким содержанием сульфата в морских и пресноводных местообитаниях СРБ (Pallud & Van Cappellen, 2006; Tarpgaard et al., 2011).

Реакция восстановления сульфата до сульфита характеризуется очень низким окислительно-восстановительным потенциалом (- 526 мВ) (Thauer et al., 2007). Поэтому, сульфат-ион вовлекается в биохимический цикл в виде аденозинфосфосульфата (APS), который образуется под действием фермента ATP-сульфурилазы (Sat), также известной как сульфатаденилилтрансфераза, в

реакции с аденозинтрифосфатом (АТР) (формула 1) (Gavel et al., 1998; Thauer et al., 1997). В результате реакции синтеза APS образуется пирофосфат, который затем используется для регенерации ATP (Peck, 1959). Гидролиз пирофосфата катализируется пирофосфатфосфогидролазой (формула 2).

$$SO_4^{2-} + ATP + 2H^+ \rightarrow APS + PPi + 46 \frac{кДж}{моль}$$
 (1)

$$PPi + H_2 O \rightarrow 2Pi - 22 \frac{\kappa Д ж}{MOЛb}$$
 (2)

Восстановление APS до бисульфита и аденозинмонофосфата (AMP), катализируется APS-редуктазой (AprAB) (формула 3).

APS +
$$2e^-$$
 + $2H^+$ ↔ HSO_3^- + $AMP - 69\frac{\kappa \mu \pi}{MOJE}$ (3)

Этот фермент был выделен из клеток разных видов *Desulfovibrio* (Fauque et al., 1991; Lampreia et al., 1994; Lopez-Cortès et al., 2005), а также из *Archaeoglobus fulgidus* (Lampreia et al., 1991; Fritz, et al., 2002). AprAB представляет собой растворимый цитоплазматический гетеродимерный железосерный флавопротеин, содержащий восемь атомов железа, распределенных в двух кластерах [4Fe–4S], и кофактор флавинадениндинуклеотид (FAD). Ключевым этапом катализируемой реакции является образование FAD-APS комплекса с последующим разложением на аденозинмонофосфат (AMP) и FAD-сульфит (Fauque et al., 1991; Lampreia et al., 1994; Parey et al., 2013).

Восстановление APS до бисульфита является экзергоническим процессом. Предполагается, что физиологическим донором электронов для AprBA является мембранный комплекс QmoABC, детерминанты которого присутствует в большинстве геномов СРБ. Перенос электронов происходит от восстановленного менахинона, который, в свою очередь, восстанавливается за счет окисления водорода периплазматической гидрогеназой (Pires et al., 2003). Возможно, при сульфатном дыхании комплекс QmoABC также выполняет функцию протонной помпы (Pereira et al., 2011). В эксперименте с *Desulfovirio* vulgaris Hildenborough, мутантным по гену qmoABC, было показано, что данный штамм не способен к росту с использованием сульфата, в то время как на сульфите и тиосульфате наблюдается нормальный рост (Zane et al., 2010). Это подтверждает важное значение комплекса Qmo для восстановления сульфата, но не сульфита. Биохимические исследования подтвердили, что существует прямое взаимодействие между AprBA и QmoABC (Ramos et al., 2012).

Восстановление бисульфита до сульфида с участием молекулярного донора электронов катализируется водорода В качестве ферментом сульфитредуктазой (DsrAB) с участием небольшого белка DsrC и мембранного комплекса DsrMKJOP. Участие DsrC в восстановлении сульфита было выявлено после исследования кристаллической структуры комплекса DsrAB-DsrC выделенного из клеток Desulfovibrio vulgaris (Oliveira et al., 2008). Из Desulfovibrio spp. DsrAB всегда выделяется в копмлексе с DsrC, что необязательно для других родов СРБ. Внутри клетки DsrC может находиться в несвязанном состоянии (Oliveira et al., 2011; Venceslau et al., 2014). Реакция восстановления сульфита происходит в два этапа. На первом этапе образуется персульфид, который связан с цистеиновым остатком DsrC. На втором этапе персульфид связывается со вторым остатком цистеина внутри молекулы DsrC. В результате образуется дисульфидная связь и высвобождается H_2S . Образовавшаяся дисульфидная связь в молекуле DsrC восстанавливается комплексом DsrMKJOP (Oliveira et al., 2011, Venceslau et al., 2014).

Комплекс DsrMKJOP включает два модуля: DsrMK, обязательный для всех СРБ и DsrJOP, который отсутствует у некоторых грамположительных СРБ, главным образом у фирмикут (Junier et al., 2010; Pereira et al., 2011; Venceslau et al., 2014). Консервативный модуль включает две субъединицы: DsrK, цитоплазматический белок с [4Fe-4S]³⁺ центром, катализирующий восстановление гетеродисульфида (Hedderich et al., 2005), и DsrM, мембранный белок, содержащий дигемовый цитохром типа-*b*. Донором электронов для DsrM является хинон-подобный кофактор – метанофеназин (Deppenmeier, 2004). 16 Модуль DsrMK, вероятно, участвует в переносе электронов из пула хинонов на дисульфидную связь в DsrC (Oliveira et et al., 2008; Pereira et al., 2011). Модуль DsrJOP, предположительно, задействован в переносе электронов между периплазмой и пулом хинонов, однако механизм остается неясным (Pires et al., 2006, Silva et al., 2012).

Окислительно-восстановительный потенциал пары HSO₃⁻/HS⁻ составляет -116 мВ (Rabus et al., 2015). Реакция происходит в соответствии уравнением 4.

$$HSO_{3}^{-} + 6e^{-} + 6H^{+} \rightarrow HS^{-} + H_{2}O - 172\frac{\kappa \#}{MOJE}$$
(4)

Полученная энергия (172)кДж/моль) компенсирует затраты на образование APS и позволяет регенерировать две молекулы ATP. Путь восстановления сульфита до сульфида несколько спорный, были предложены два механизма (LeGall and Fauque, 1988). Первый представляет собой прямое восстановление бисульфита в одну стадию, катализируемое диссимиляционной сульфитредуктазой, без образования промежуточных соединений. Второй механизм представляет цикл, так называемый, тритионатный путь, в котором тритионат и тиосульфат являются промежуточными продуктами. При этом процесс проходит в три этапа (Akagi, 1995; Cypionka, 1995; Rabus et al., 2006). В подтверждение теории тритионатного приводятся результаты пути эксперимента по измерению диссимиляционной сульфитредуктазы in vitro в культурах Desulfovibrio, при котором происходит образование сульфида, тритионата и тиосульфата (LeGall and Fauque, 1988; Oliveira et al., 2008; Barton and Fauque, 2009; Parey et al., 2010).

Диссимиляционные сульфитредуктазы делятся на четыре класса по способности к поглощению в видимом диапазоне длин волн (Rabus & Strittmatter, 2007). К ним относят: (1) десульфовиридин с пиком поглощения при 628 нм, характерный для видов рода *Desulfovibrio* (Lee & Peck, 1971; Moura et al., 1988; Pierik & Hagen, 1991; Wolfe et al., 1994), (2) десульфорубидин с характерным пиком поглощения при 545 нм, присутствующий у

представителей *Desulfomicrobium* и *Desulfosarcina* (Lee et al., 1973; Moura et al., 1988; Arendsen et al., 1993); (3) десульфофусцидин с пиком поглощения при 576 нм, присутствующий в клетках *Thermodesulfobacterium* spp. (Hatchikian, 1994) и (4) белок P-582 с пиком поглощения при 582 нм, присутствующий в клетках *Desulfotomaculum* spp. (Akagi et al., 1974). Указанные сульфитредуктазы различаются типами кофакторов (Rabus & Strittmatter, 2007). Геномные исследования выявили большое количество новых последовательностей dsrAB, что может указывать на существование ещё не описанных таксонов СРБ (Muller et al., 2015).

1.2. Распространение СРБ в отходах добычи металлов и их использование для очистки

Отходы биовыщелачивания и кислые шахтные дренажи (КШД) характеризуются низкими значениями pH и высокими концентрациями сульфатов и тяжелых металлов. Образование КШД происходит в результате окисления сульфидных минералов кислородом воздуха, а также железо- и серуокисляющими хемолитоавтотрофами. Места образования КШД связаны с отходами добычи и переработки сульфидных руд: хвостохранилищами отходов флотации, пирометаллургическим шлаком, хранилищами вскрышных пород.

КШД попадают в водоносные горизонты и подземные воды, ухудшая качество воды и нанося ущерб живым организмам. В целом, КШД стали крупнейшей экологической проблемой из-за своей токсичности и широкого распространения во всем мире (Gray, 1997; Kim and Chon, 2001; Grande et al., 2005; Neculita et al., 2007).

1.2.1. СРБ в окисленных отходах добычи металлов и механизмы защиты от окислительного стресса

Современные взгляды на сульфатредукцию предполагают возможность активного восстановления SO_4^{2} в окисленных системах организмами, ранее считавшимися строгими анаэробами. Так, численность и метаболическая активность сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) в кислородной зоне многочисленных биотопов часто оценивается выше, чем в соседних бескислородных зонах (Ravenschlag et al., 2000; Mußmann et al., 2005; Sass et al., 1997; Sass et al., 1998).

Ранее было показано, что окисленные условия не являются препятствием для активности сульфатредукторов и образования биогенных сульфидов в окисленных отходах добычи металлов (Karnachuk et al., 2005). Некоторые СРБ проявляют высокую устойчивость к кислороду и в чистой культуре (Cypionka et al., 1985) благодаря имеющимся механизмам защиты. К таким механизмам относятся агрегация или аэротаксис, а также различные ферментные системы, способствующие восстановлению и устранению кислорода и его активных форм. В последнее время появляется все больше сообщений о наличии в геномах анаэробных микроорганизмов генов, кодирующих терминальные участвующие аэробных оксидоредуктазы, в дыхательной цепи микроорганизмов. В анаэробных микроорганизмах эти мембранные комплексы участвуют в защите от кислорода (Cypionka, 2000; Dolla et al., 2006; Kawasaki et Среди анаэробных микроорганизмов СРБ являются одной из al., 2009). наиболее изученных групп в отношении устойчивости к кислороду. Изначально СРБ рассматривались как строгие анаэробы, однако позднее появились сообщения о присутствии микроорганизмов этой физиологической группы во многих окисленных местах обитания (Mussmann et al., 2005; Ravenschlag et al., 2000; Sass et al., 1998). СРБ были обнаружены в фототрофном верхнем слое микробных матов (Teske et al., 1998). Некоторые чистые культуры демонстрируют относительно высокие уровни устойчивости к кислороду, 19

жизнеспособность после длительного воздействия сохраняя воздухом (Cypionka et al., 1985; Abdollahi & Wimpenny, 1990). Однако, в присутствии килорода наблюдается снижение жизнеспособности и подвижности клеток (Marschall et al., 1993), морфологические изменения и ингибирование сульфатного дыхания (Krekeler et al., 1997), что свидетельствует о токсичном действии кислорода на СРБ. На молекулярном уровне механизмы защиты были хорошо изучены для некоторых видов рода Desulfovibrio. Они включают мембранные оксидоредуктазы, цитоплазматический рубредоксин (Frazao et al., 2000; Santos et al., 1993; Wildschut et al., 2006) и периплазматические гидрогеназы и цитохромы (Baumgarten et al. 2001; Fournier et al., 2004). Впервые мембранно-связанной bd наличие хинон-оксидазы было показано в мембранных фракциях Desulfovibrio gigas (Lemos et al., 2001). В геноме Desulfovibrio vulgaris Miyazaki был обнаружен ген, кодирующий цитохром соксидазу (Kitamura et al., 1995). Для *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough было показано, что цитохром с-оксидаза, содержит два гема с-типа (Lobo et al., 2008). Гены мембранно-связанных кислородредуктаз обнаружены методам гибридизации и ПЦР в нескольких изолятах Desulfovibrio, выделенных из соляных отложений (Santana, 2008).



Рис. 2. Общая модель системы детоксикации кислорода в клетках *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. Адаптировано из Lamrabet et al., 2011.

Система молекулярной детоксикации кислорода в клетках Desulfovibrio vulgaris Hildenborough (рис. 2) включает цитоплазматический комплекс NADHрубредоксин-оксидоредуктазу (NRO), железосодержащий рубредоксин (Rd) и рубредоксиноксигеноредуктазу (ROO), которая восстанавливает кислород до воды. Периплазматический комплекс состоит из растворимых гидрогеназ, восстанавливают цитохромы которые с-типа с низким окислительновосстановительным потенциалом, которые, в свою очередь, детоксицируют О₂. Система, связанная с мембраной, состоит из хинон-оксидазы bd и с $cc(0/b)o_{3}$, цитохромоксидазы которые восстанавливают O_2 ДО воды. Эксперименты со штаммами Desulfovibrio vulgaris Hildenborough, имеющим кодирующим bd-хинон-оксидазу (Δbd) мутации ПО генам. И Cцитохромоксидазы (Δcox), показали, что наибольший вклад в устойчивость к кислороду вносит bd-хинон-оксидаза (Ramel et al., 2015).

При исследовании микробных процессов в КШД научные группы традиционно уделяли мало внимания сульфатредукции, так как присутствие анаэробных процессов считали маловероятным в высокоокисленных экосистемах. Однако, изучение разнообразия СРБ в КШД выявило наличие большого разнообразия видов СРБ относящихся к филумам Firmicutes и Proteobacteria (Sánchez-Andrea et al., 2014) (рис. 3).



Рис. 3. Филогенетическое положение последовательностей 16S рРНК СРБ, детектированных в реакторах очистки КШД (по Sánchez-Andrea et al., 2014).

1.2.2. Биотехнологии очистки отходов добычи металлов на основе СРБ

Очистка КШД от тяжелых металлов основана на химизме диссимиляционной сульфатредукции. Конечный продукт восстановления сульфата, высокореакционный сероводород, связывает металлы в сульфиды с низкой растворимостью. Одновременно происходит потребление протонов водорода, что повышает pH среды. КШД содержат низкие концентрации органического углерода, например, до 10 мг/л (Koschorreck et al., 2003).

Среди существующих биотехнологий различают два типа – пассивные и активные. Первые наиболее востребованы, так как отличаются низкими эксплуатационными расходами и могут эксплуатироваться длительное время. К пассивным технологиям можно отнести анаэробные ветланды и проницаемые реакционные барьеры (ПРБ), однако, эти технологии могут быть применимы не во всех случаях (Johnson et al., 2005). Они менее эффективны, чем активные системы, и иногда требуют значительных затрат на этапе строительства (Johnson et al., 2005; Eger, 1994). Например, подготовка ПРБ и заполнение его реакционным материалом весьма затратно (Benner et al., 1997, Younger et al., 2003). Для пассивных систем применяются органические удобрения, выбор которых осуществляется в соответствии с их локальной доступностью и доказанной эффективностью (Kijjanapanich et al., 2012). В случае применения этого подхода, разложение субстрата имеет решающее значение для успеха микробиологической очистки (Gibert et al., 2004). Компосты получают путем смешивания биоразлагаемых материалов (грибной компост или навоз) с более сложными материалами (торф, солома, опилки) (Vile et al., 1993).

Активные системы подразумевают использование реакторов, которые позволяют лучше контролировать параметры и характеристики процесса. Сульфидогенные реакторы основаны на активности СРБ (Muyzer et al., 2008). Восстановление сульфата приводит к потреблению протонов с повышением pH и образованием высокореакционного сульфида водорода (H₂S). H₂S реагирует с тяжелыми металлами, такими как Fe, Zn, Cu, Cd, Ni и Pb, приводя к осаждению

металлов (Alazard et al., 2010; Eger, 1994). сульфидов нерастворимых сульфиды металлы могут быть Осажденные в извлечены и повторно использованы в производственных процессах. Использование СРБ для очистки кислых вод, содержащих высокие концентрации металла и, зачастую, высокие концентрации сульфата, является технологией с доказанной эффективностью (Eger, 1994; Muyzer et al., 2008; Valls et al., 2002). К настоящему моменту различные масштабы конфигурации протестированы И биореакторов, биореакторы, например, полевые реакторы, опытно-промышленные лабораторные биореакторы и другие (Sánchez-Andrea et al., 2014). Эти технологии были подробно рассмотрены в работе Neculita с соавторами (Neculita et al., 2007), и был сделан вывод, что для достижения оптимальной производительности предпочтительным является использование смеси, а не отдельных субстратов.

работают Сульфидогенные реакторы В различных режимах (периодический, непрерывный или полунепрерывный), причем наиболее часто применяется непрерывный режим. Широко используются две основные эксплуатационные конструкции для осаждения сульфидов металлов. Первая основана на двухступенчатом процессе, где сульфатредукция происходит в одном реакторе, а полученный газообразный сульфид поступает в другой реактор для осаждения сульфидов металлов в контролируемых условиях. Второй тип процесса проводится в одном реакторе, где идет совместный восстановления сульфата Выбранная процесс И осаждения металлов. конструкция влияет на размер и форму образуемых кристаллических форм сульфидов. Когда концентрация H₂S небольшая, скорость образования новых нерастворимых частиц будет низкой. В результате будут образовываться более крупные кристаллы вместо формирования новых частиц (Mersmann, 1999). В одностадийном реакторе, где сульфид образуется непосредственно СРБ, будет достигаться гомогенная концентрация сульфидов и размер кристаллов будет больше. В двухстадийном реакторе будут образовываться более мелкие Известно, что сайтами частицы. микроорганизмы являются важными

23

нуклеации при осаждении металлов, это ускоряет процессы их осаждения (Kaksonen and Puhakka, 2007). Разобщение процесса на два реактора микробиологический и химический - значительно удлиняет процесс образования сульфидов металлов во времени, снижая количество сайтов нуклеации. Исходя из этого, одностадийная конструкция реактора может быть более предпочтительной для извлечения металлов. Другими преимуществами одностадийных реакторных устройств являются снижение инвестиционных затрат и более простой процесс проектирования.

Для успешного функционирования сульфидогенных биореакторов по очистке КШД необходимо использование ацидофильных сообществ или чистых культур СРБ, чтобы не происходило ингибирование их роста вследствие низких значений рН. Например, было показано, что нейтрофильный посевной материал функционировал в биореакторе при pH не менее 4 (Bijmans et al., 2010), в то время как при культивировании смешанного сообщества ацидофильных СРБ, полученного из природных экстремально кислых сред, было показано селективное извлечение металлов при pH 2.2-2.5 (Nancucheo et al., 2012). Есть исследования, свидетельствующие о способности К селективному осаждению меди и цинка из смешанного раствора металлов при pH 3 с помощью Desulfosporosinus acidiphilus (Jameson et al., 2010). В другой работе показана способность ацидотолерантного штамма Desulfosporosinus sp. DB осаждать сульфиды меди в виде халькопирита и ковеллита в лабораторных условиях (Ikkert et al., 2013).

1.2.3. Использование ацидофильных и нейтрофильных СРБ в схемах очистки отходов добычи металлов

Важным вопросом является различие в продуктивности ацидофильных и нейтрофильных СРБ. В общем, их пищевые предпочтения сходны за очевидным исключением оптимальных pH и диапазона pH для роста, и влиянию таких факторов, как концентрация сульфида и органических кислот.

Время удвоения в значительной мере зависит от штамма и условий культивирования (донора электронов и концентрации органического субстрата, используемого восстановительного агента, и т.д.) и, таким образом, корректное сравнение не всегда возможно. В настоящее время недостаточно информации для проведения сравнения кинетических параметров роста ацидофилов с нейтрофильными штаммами. Если взять в качестве эталона первый валидно описанный штамм CPБ Desulfosporosinus acidiphilus, скорость его роста на глицерине составляет 0.4 ч⁻¹ при рН 5.2 (время удвоения 1.7 ч) (Alazard et al., 2010). Недавно предложенный новый ацидофильный вид Desulfosporosinus *acididurans* показал скорость роста 0.046 y^{-1} (при времени удвоения 15 ч) при (Sánchez-Andrea et al.. 2014). 5.5 глицерине рH на Ближайшими нейтрофильными штаммами СРБ, для которых имеется информация о ростовых параметрах, являются Desulfosporosinus lacus и Desulfosporosinus burensis. D. *lacus* при pH 7 на лактате показал скорость роста 0.08 ч⁻¹, что соответствует времени удвоения 8.6 ч (Ramamoorthy et al., 2006). D. burensis показал на фруктозе скорость роста 0.095 ч⁻¹, что эквивалентно времени удвоения 7.3 ч (Mayeux et al., 2013).

Другим параметром для сравнения может быть скорость сульфатредукции (ССР). ССР новой ацидофильной СРБ *D. acididurans* составляла 33 фмоль/клеток в сутки (Sánchez-Andrea et al., 2014), что попадает в диапазон показателей ССР для различных нейтрофильных штаммов (от 0.9 до 434 фмоль на клетку в сутки) (Detmers et al., 2001). Хотя необходимо провести больше исследований в сопоставимых условиях, предварительные данные показывают, что при оптимальных условиях ацидофильные и нейтрофильные СРБ имеют сходную продуктивность.

Таким образом, сульфидогенные реакторы имеют некоторые преимущества по сравнению с другими технологиями, такие как высокая эффективность очистки от металлов и сульфатов (Feng et al., 2000), возможность селективного осаждения металлов, основанная на их различной растворимости при низких значениях pH (Bijmans et al., 2008; Boonstra et al., 25 1999). Для повторного извлечения металлов ключевым фактором является образование чистого или сильно обогащенного сульфида металла. Образование сульфидов металлов зависит от концентрации ионов металлов, ионов сульфида и особенно pH (Veeken et al., 2003; Huisman et al., 2006). Например, при работе реактора при pH 4-4.5, такие металлы, как медь, никель и цинк могут быть осаждены селективно, в то время как железо останется в растворе, что значимо при необходимости отделить от железа остальные металлы (Tabak et al., 2003; Veeken et al., 2003; Nancucheo et al., 2012).

Процесс извлечения металлов в биореакторах, действующих при низких значениях pH, имеет несколько преимуществ. Во-первых, можно избежать добавления нейтрализующих реагентов, чтобы уменьшить затраты. Во-вторых, образуемый сульфид при низком pH находится в основном в газовой фазе, что упрощает отделение сульфида от сточных вод с использованием хорошо известных технологий, например, с помощью последующего осаждения металла (Tabak et al., 2003; Veeken et al., 2003) или окисления серы кислородом (Janssen et al., 2008). Кроме того, СРБ будут лучше вытеснять метаногенов при низких значениях pH (Bijmans et al., 2008), так как метан более чувствителен к низким pH. B результате, меньше дорогостоящего донора электронов расходуется в других процессах, отличных от восстановления сульфатов (ацетогенез, метаногенез), что увеличивает эффективность процесса в целом.

Так как большинство известных СРБ являются нейтрофилами и оптимальные значения pH для их роста составляют от 6 до 8 (Widdel, 1992), большинство сульфидогенных биореакторов работает с предварительно нейтрализованным материалом (Van Houten et al., 1994). Однако использование ацидотолерантных и ацидофильных СРБ делает возможным очищать кислые стоки напрямую, без предварительной нейтрализации. До тех пор, пока процесс сульфатредукции повышает уровень pH самостоятельно, большинство реакторов может работать без контроля pH (Hiibel et al., 2008; Hiibel et al., 2011; Kaksonen et al., 2003; Kolmert et al., 2001). Однако, в данном случае, металлы

выпадают в осадок одновременно, что является полезным для биологической очистки, но невыгодно для извлечения металла.

Мировым лидером в разработке биотехнологических процессов для осаждения и рециклирования металлов с использованием сульфидогенных микроорганизмов является голландская компания Paques BV (Paques: [сайт]. URL: http://www.paques.nl/en/about paques). Одним из полномасштабных процессов, основанных на осаждении металлов биогенным сероводородом, является процесс Sulfateq TM, основанный на технологиях Thioteq. Процесс Thioteq состоит из двух стадий: химической и биологической. Содержащий металлы раствор подвергается обработке сероводородом только на химической стадии. Сероводород образуется в отдельном биореакторе и подается в химический реактор с использованием газа-носителя. Содержание сульфида меди в продукте осаждения обычно составляет не менее 90%. Полученные в результате осаждения сульфиды металлов могут поступать в металлургический процесс в качестве концентрата высокого качества. Разобщение процессов производства H₂S и осаждения сульфидов связано с токсичностью высоких бактерий. Разобщение процессов образования концентраций меди для сероводорода бактериями и осаждения металлов является одним из основных недостатков подобного рода технологий.

Для отраслей промышленности, связанных с получением смешанных растворов металлов, необходимо применение новых технологий, основанных на использовании высокопродуктивных устойчивых к высоким концентрациям тяжелых металлов штаммов и/или консорциумов микроорганизмов.

1.3. Ацидофильные СРБ – выделение и культивирование

Микроорганизмы, обитающие при низких pH, выработали ряд механизмов устойчивости к этим условиям. К таким механизмам относится поддержание внутриклеточного гомеостаза в районе нейтрального и около нейтрального pH благодаря активной работы протонных помп, выкачивающих излишки протонов из клетки (Matin, 1999; Konings, et al. 2002). Многие ацидофильные микроорганизмы синтезируют белки, стабильные при низких pH. Эффективность и наличие механизмов устойчивости определяет диапазон pH, в котором могут существовать микроорганизмы (Baker-Austin and Dopson, 2007).

Долгое время вопрос о существовании ацидофильных СРБ оставался открытым. Большинство известных СРБ имеют оптимум рН для роста около 7 и их рост ингибируется при значениях pH ниже 6 (Widdel 1988; Fauque et al., 2004). С конца 1960-х годов сообщалось о диссимиляционном восстановлении сульфата в кислых местообитаниях, таких как сульфидные руды и угольные природные и антропогенные экосистемы карьеры, другие С низкими значениями pH (Tuttle et al., 1969; Gyure et al., 1990; Johnson et al., 1993; Kolmert et al., 2001; Koschorreck et al., 2003; Johnson et al., 2009; Moreau et al., 2010; Sanchez-Andrea et al., 2012). Также показано, что сульфатредукция имеет место в растворах с низким pH в биореакторах (Kolmert et al., 2001; Sierra-Alvarez et al., 2006). Большинство изолятов СРБ, выделенных из КШД, оказывалось нейтрофилами, которые не росли при pH ниже 5 (Tuttle et al., 1969; Gyure et al., 1990; Lee et al., 2009; Kusel et al., 2014). Так, изоляты, полученные из накопительных культур, восстанавливающих сульфат при рН 3.8, были неспособны расти при pH ниже 5.5 (Tuttle et al., 1969; Gyure et al., 1990).

На сегодняшний день в чистой культуре получено небольшое количество СРБ. По ацидофильных ацидотолерантных И мнению некоторых исследователей, это может быть связано с неподходящими методами, используемыми для получения накопительных и чистых культур (Kimura et al., 2006; Koschorreck 2008; Alazard et al., 2010; Sánchez-Andrea et al., 2014). Б. Джонсон предположил, что неудачи в выделении ацидофильных СРБ могут быть из-за использования лактата в составе питательной среды (Johnson, 2014), который действует преимущественно как токсичная недиссоциированная кислота при низких рН. Также присутствие СРБ в кислых средах может быть обусловлено стратегией выживания путем создания микрозон с нейтральными pH, что согласуется с механизмом сульфатредукции при котором происходит потребление протонов (Milucka et al., 2012).

Одними из первых СРБ, выделенных в чистую культуру, были грамположительные спорообразующие представители рода Desulfosporosinus из White river (Монтсеррат) и заброшенного медного рудника Mynydd Parys (Уэльс), растущие при низких значениях рН (до 3.8) с использованием глицерола как донора электрона (Sen et al., 1999). Авторы объясняют причину СРБ успеха В получении ацидофильных использованием некислых органических субстратов (глицерол, метанол). Позднее были описано еще несколько штаммов ацидофильных СРБ. Среди них термофильный относящийся К филуму Firmicutes, Thermodesulfobium микроорганизм, narugense, выделенный из горячего источника в Японии (Mori et al., 2003). Т. narugense растет в диапазоне pH от 4.0 до 6.5. Недавно был описан новый термоацидофил Thermodesulfobium acidiphilum с оптимумом pH 3.7-6.5, который был выделен из почвенной пробы кальдеры Узон на Камчатке (Frolov et al., 2017).

Desulfosporosinus sp. DB, имеющий оптимум роста pH 4.5 – 5.0, был выделен из кислых отходов добычи меди в Кузбассе (Карначук и др., 2009). В 2010 году был валидно описан первый ацидофильный сульфатредуктор, *Desulfosporosinus acidiphilus*, с оптимумом pH 5.2 (Alazard et al., 2010). Бактерия была выделена из осадков кислых шахтных вод (отходы добычи меди на шахте Chessy, Божоле, Франция). В 2011 году был секвенирован первый геном ацидофильного *Desulfosporosinus* sp. OT, выделенного из кислых осадков хвостохранилища добычи меди в Норильске (Abicht et al., 2011). Позднее была определена последовательность генома D. acidiphilus вместе с тремя нейтрофильными представителями этого рода (Pester et al., 2012). Родственные D. acidiphilus ацидофильные штаммы были выделены из Рио Тинто (Sánchez-Andrea et al., 2013, 2014). Диапазон pH для их роста составляет 3.8 – 7 с оптимумом рН 5.5. Есть сообщения 0 пока не валидизированных представителях рода Desulfosporosinus, способных расти при низких pH (Kusel 29 et al., 2001; Senko et al. 2009; Abicht et al., 2011; Jameson et al., 2010 Карначук и др. 2009, 2015; Karnachuk et al., 2017).

К настоящему моменту все известные облигатно ацидофильные изоляты СРБ относились к отделу Firmicutes, и подавляющее большинство из них принадлежит роду *Desulfosporosinus*. О представителях ацидофильных СРБ других филогенетических линий практически нет информации. Нуклеотидные последовательности представителей дельтапротеобактериальных СРБ детектируются в ацидофильных экосистемах и биореакторах очистки КШД молекулярными методами, однако культивируемых ацидофильных представителей Deltaproteobacteria не получено к настоящему моменту.

Сведения об ацидотолерантных представителях этой группы также весьма ограничены. В литературе есть информация об умеренно ацидофильном и умеренно галофильном представителе СРБ *Desulfovibrio bastinii*, выделенном из глубинных подземных вод, ассоциированных с нефтяными пластами, и растущем в диапазоне pH 5.2 – 7.4 с оптимумом 5.8 – 6.2 (Magot et al., 2004). Из пробы, отобранной на месте золотодобычи в Западной Сибири, получен изолят *Desulfovibrio* sp. TomC, устойчивый к меди и способный расти в дипазоне pH 2.5 - 7.5 с оптимумом 5.5 (Karnachuk et al., 2015). Его ближайшим валидно описанным родственником (на основании анализа последовательности генома) является штамм *Desulfovibrio magneticus* RS-1.

1.4. Образование сульфидов металлов СРБ

Биогенный сероводород играет важную роль в связывании металлов в различных типах экоситем в виде сульфидов (Skousen et al., 1998; Cao et al., 2009). В морских и пресноводных отложениях чаще всего встречаются сульфиды железа, которые также имеют биогенную природу (Gramp et al., 2010). Осаждение металлов в виде сульфидов является более выгодным процессом для очистки сточных вод металлургических предприятий, благодаря тому, что объем сульфида в 6-10 раз меньше чем объём гидроксида, 30 полученного из такого же количества металла (Huisman et al., 2006). В результате деятельности СРБ также снижается риск повторного растворения металлов из образованных сульфидов благодаря их низкой растворимости (0.1-1 мг л⁻¹) (Huisman et al., 2006).

Гетерогенное образование минералов кинетически более выгодно, чем гомогенное. Это связано с тем, что для начала кристаллообразования необходим центр кристаллизации. Центрами кристаллизации могут служить различные биологические структуры. Роль поверхностных структур бактериальных клеток в образовании биогенных минералов была рассмотрена в ряде научных работ (Schultze-Lam et al., 1996; Fortin et al., 1997; Konhauser, 1998; Bazylinski and Frankel, 2003; Gilbert et al., 2005). Независимо от типа клеточной стенки, поверхность бактериальных строения клеток имеет отрицательный заряд (Fortin et al., 1997). Это характерно и для внешних структур, таких как капсулы из кислых полисахаридов, S-слои на поверхности клеточной стенки (Beveridge, 1989), филаменты, богатые карбоксильными группами (Gilbert et al., 2005). Отрицательный заряд способствует аккумуляции катионов металлов, таким образом, формируется сайт нуклеации кристалла (Fortin et al., 1997; Gilbert et al., 2005).

1.4.1. Образование сульфидов железа под действием СРБ

В результате реакции мобилизованных катионов с биогенным сероводородом образуются аморфные и нанокристаллические сульфиды. На поверхности клеток СРБ из осадков пресноводных озер было показано присутствие аморфного сульфида железа и нанокристаллов миллерита (NiS) (Ferris et al., 1987). В экспериментах было показано, что слой сульфида железа может покрывать как внешние, так и внутренние поверхности мембран сульфатредуцирующих прокариот (Donald and Southam, 1999; Watson et al., 2000) (рис. 4).



Рис. 4. Микрофотография клетки СРБ, инкрустированная кристаллическим сульфидом железа. Просвечивающая электронная микроскопия, ультратонкий срез (Watson et al., 2000).

Сульфиды металлов, образованные в результате деятельности СРБ, имеют различную морфологию и размеры. Было описано образование нанокристаллов сульфида железа размером 4 нм (Wolthers et al., 2003). В культуральной жидкости после культивирования СРБ обнаружены кристаллы маккинавита ((Fe,Ni)₉S₈) диаметром 100-300 нм, которые образовывали глобулы 1-2 мкм в диаметре (Herbert et al., 1998).

На дальнейшее преобразование маккинавита может влиять присутствие в среде некоторых органических соединений. В присутствии альдегидов двухвалентное железо в моносульфиде частично окисляется с образованием грейгита (Fe₃S₄), тогда как в отсутствии альдегидов происходит окисление серы и образуется пирит (FeS₂) (Rickard et al., 2001). Также были показаны различия в составе кристаллических фаз, образованных биогенным путем и в химическом контроле (Jencarova et al., 2014). При культивировании консорциума СРБ в присутствии сульфата железа, образованный осадок в минеральной фазе содержал маккинавит (Fe₉S₈) и грейгит (Fe₃S₄), в то время как в опыте без использования микроорганизмов обнаруживали только фосфат

железа, вивианит (Fe₃(PO₄)₂ \cdot 8H₂O). Модификация среды отражалась на количественном соотношении указанных минералов в осадке (Jencarova et al., 2014).

Кристаллический сульфид железа входит в состав специфических органелл некоторых СРБ, магнетосом. Кристалл магнетосомы формируется внутри визикулы, а затем присоединяется к магнитотактическому агрегату, который может состоять из упорядоченных кристаллов грейгита (Fe₃S₄) или FeS). маккинавита (тетрагональный расположенных В ОДНУ или две параллельные линии (Lins and Farina, 1999; Keim et al., 2004) (рис. 5). Сульфидсодержащие магнетосомы были обнаружены у СРБ, относящихся к Deltaproteobacteria (DeLong et al., 1993), и у некоторых Gammaproteobacteria (Simmons et al., 2004). В клетках Desulfovibrio magneticus RS-1 в присутствии фумарата в качестве акцептора электронов, формировались пулевидные магнитные частицы (Sakaguchi et al., 1993, 2002; Kawaguchi et al., 1995) (рис. 5). При ЭТОМ присутствии других акцепторов они практически не В культуральной образовывались. В жидкости при культивировании D. magneticus RS-1 также обнаруживали магнитный сульфид железа (Sakaguchi et al., 1993) и гематит (Posfai et al., 2006).



Рис. 5. Микрофотографии *Desulfovibrio magneticus* RS-1. Просвечивающая электронная микроскопия, ультратонкий срез (обзор Arakaki et al., 2008).

1.4.2. Образование сульфидов металлов, отличных от железа, под действием СРБ

Среди немногочисленных примеров исследований, посвященных образованию сульфидов металлов, отличных от железа, можно выделить образование сфалерита (ZnS) в биопленках (Labrenz et al., 2000; Labrenz and Banfield, 2004). Обнаруженные в условиях карбонатных свинцово-цинковых отложений частицы ZnS не содержали примесей и были связаны с клетками СРБ, что свидетельствует об их биогенном происхождении (Moreau et al., 2004).

Было изучено также образование кристаллических фаз сульфидов меди под действием культур СРБ. Подтверждено образование сульфидов меди и железа СРБ в составе культивируемых консорциумов (Gramp et al., 2006, 2007). Сульфид меди был успешно получен путем продувания раствора сульфата меди биогенным сероводородом, произведенным в отдельном биореакторе СРБ (Bhagat et al., 2004). При этом до 99% Сu было удалено из раствора при смешивании его с супернатантом из биореактора. Также было показано образование сульфида меди в биопленках, образованных СРБ (White and Gadd, 2000). Эффективное образование сульфидов под действием консорциума сульфатредуцирующих бактерий описано для раствора, содержащего смесь металлов (Cu, Zn, Ni, Fe, Al и Mg), в анаэробном биореакторе. Для эксперимента использовали сульфаты и арсенаты металлов, в результате были получены сульфиды Cu, Zn, Ni, Fe и As (Jong et al., 2003).

Образование кристаллических соединений меди исследовалось и в чистых культурах. При культивировании устойчивых к меди штаммов рода *Desulfovibrio* в присутствии металла в культуральной жидкости в составе осадков были определены ковеллит (CuS), халькоцит (Cu₂S) и халькопирит (CuFeS₂) (Karnachuk et al., 2003; Karnachuk et al., 2008). В осадках после культивирования штаммов *Desulfosporosinus* также обнаруживали ковеллит и халькопирит (Ikkert et al., 2013; Kaphaчук и др., 2015). Образование наноразмерных сульфидов кобальта и никеля изучали в консорциумах СРБ (Sitte et al., 2013). Однако образование сульфидов кобальта под действием чистых культур СРБ до настоящего времени не исследовано.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Для проведения исследования в 2014 году были отобраны пробы воды и органических обрастаний на территориях добычи полезных ископаемых Забайкальского Края. Из отобранных проб были получены чистые и накопительные культуры СРБ.

Также из коллекции лаборатории были взяты ранее выделенные чистые культуры ацидофильных/ацидотолерантных СРБ рода *Desulfosporosinus*. При проведении исследований по устойчивости к кислороду использовали также штамм *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough*, который был любезно предоставлен сотрудниками Лаборатории химии бактерий Национального Исследовательского Центра Франции в Марселе.

2.1.1. Описание мест отбора проб

Пробы были получены из двух сайтов, расположенных на территории Забайкальского края (рис. 6 А).

Шерловогорское месторождение располагается рядом с птт. Шерловая гора Борзинского района (рис. 6 Б), в 250 км Юго-Восточнее Читы в системе Восточно-Агинского разлома на сочленении двух геолого-структурных зон Восточного Забайкалья – Агинской геоструктурной зоны и Аргунского срединного массива (Абрамов, 2011). С 1932 на месторождении открытым способом добывались полиметаллические руды. В первую очередь добыча была направлена на получение вольфрама, висмута и олова. Основной объем приходился на кассетерит, арсенопирит, халькопирит, сфалерит и пирит, в меньшем объеме марказит, пирротин, галенит и ильменит (Кулагашев, 1968). С 1962 по 1992 годы на территории месторождения работал горно-обогатительный комбинат (ГОК). В 1992 году эксплуатация карьера была прекращена и в настоящее время он находится в частично-затопленном состоянии.

35



Рис. 6. Расположение сайтов и мест отбора проб:(А) Обзорная карта; (Б) Месторождение Шерловая гора. Место отбора пробы ShG-14-1; (В) Акатуйское месторождение. Место отбора проб ShG-14-4 и ShG-14-5.

На восточной террасе карьера находится группа шурфов глубиной от 7 до 17 м и диаметром 0.2 м, некоторые из них затоплены водой. Шурф ShG14-1 представляет собой открытую вертикальную скважину глубиной 7.5 м (рис. 7 А, Б). Высота водяного столба в шурфе на момент отбора пробы составляла 1 м.

Акатуйское месторождение (Акатуйское B) рудное поле) (рис. 6 расположено на Северо-Западной окраине поселка Новый Акатуй Александрово-Заводского района Забайкальского края. Акатуевское рудное поле приурочено к участку сопряжения северо-восточного Борзинско-Газимурского разлома с субмеридиональной Бугдая-Акатуевской системой нарушений. Разработка Акатуевскго месторождения началась в 1815 году, когда была найдена серебросодержащая руда. Добыча осуществлялась подземным способом (Banks et
al., 2014). Основные рудные минералы: галенит, сфалерит, пирит, арсенопирит, буланжерит и пирротин. До глубины 40–80 м руды окислены и представлены смесью лимонита, церуссита, смитсонита и остаточного галенита с кварцем. В значительных количествах сульфид-содержащие минералы (такие как пирит и чвилеваит) присутствуют в хвостохранилищах (Добровольская, 1996).



Рис. 7. Места отбора проб: (А) Заброшенный карьер добычи полиметаллов на месторождении Шерловая Гора и (Б) шурф ShG-14-1; (В) Дамба, ограничивающая хвостохранилище отходов добычи цинка-свинца на Акатуйском месторождении и (Г) высачивания из-под дамбы, где была отобрана проба ShG-14-4; (Д) Заброшенный выход из шахты на Акатуйском месторождении и (Е) микробные обрастания, проба ShG-14-5.

Месторождение было закрыто в 2002 году, с этого времени происходит затопление подземных выработок грунтовыми водами, излишки воды перетекают

через горизонтальный туннель в зону хвостохранилища. Инфильтрованная вода имеет выход с обратной стороны дамбы, ограничивающей хвостохранилище, разлив воды образует болото с зонами окисления (Рис. 7 В). Проба ShG14-4 отобрана в месте выхода воды на поверхность (Рис. 7 Г), здесь наблюдали зоны черного цвета и присутствовал запах сероводорода, а также массовые стримеры зеленого и оранжевого цвета.

На территории хвостохранилища, в районе стыка между верхним и средним уровнем хвостов находится вход в горизонтальный туннель, из которого постоянно вытекает поток воды (рис. 7 Д). Вход в туннель датирован 1959 годом. За каменным порталом располагаются деревянные подпирающие конструкции. В течении ручья также присутствовали стримеры, поверхности деревянных конструкций были покрыты обрастаниями толщиной 2-3 мм, состоящими из четырех слоев разного цвета (верхний – зеленый, далее желтый, белый и черный) (рис. 7 Е). Здесь была отобрана проба ShG14-5.

2.1.2. Использованные штаммы СРБ

Для проведения исследований были использованы штаммы ацидофильных СРБ из коллекции Лаборатории биохимии и молекулярной биологии при Кафедре физиологии растений и биотехнологии ТГУ:

 Desulfosporosinus sp. 12 - ацидофильная, спорообразующая СРБ, выделенная из отходов золотодобычи на месторождении в Западной Сибири (Mardanov et al., 2016). Штамм I2 представляет собой слегка изогнутые подвижные палочки 0.5-1 х 3-6 мкм. Клетки окрашиваются грамотрицательно, хотя микроструктура указывает на грамположительное строение. Desulfosporosinus sp. I2 проявляет психротолерантность, оптимальный рост отмечен в диапазоне температур 22 °C – 28 °C. Использует лактат, пируват, малат, цитрат, сукцинат, фумарат, бутират, этанол, глицерин, бутанол, формиат, пальмитат и пептон в качестве источников углерода и доноров электронов для восстановления сульфата. Способен расти в диапазоне pH от 1.7 до 7.0 с оптимумом pH 2.6. Филогенетический анализ гена 38 16S pPHK показал, что *Desulfosporosinus burensis* является наиболее близкородственным организмом с гомологией последовательности 98% (Mardanov et al., 2016).

2. Desulfosporosinus sp. BG – ацидофильная, спорообразующая СРБ, выделенная из хвостохранилища молибден-вольфрамового рудника Бом-Горхон в Забайкальском крае (Карначук и др., 2015). Штамм способен к росту в диапазоне pH от 1 до 6.5 с оптимумом 2. По последовательности гена 16S pPHK наиболее близок к Desulfosporosinus lacus, с гомологией 97%. В качестве доноров электронов и источников углерода утилизирует лактат и глицерол. Desulfosporosinus sp. BG проявляет устойчивость к меди и растет в присутствии 6 г Cu (II) на л среды (Карначук и др., 2015).

При проведении исследований по устойчивости СРБ к кислороду в качестве Desulfovibrio референсной культуры был использован штамм vulgaris Hildenborough (NCIMB 8303), любезно предоставленный сотрудниками бактерий Национального Исследовательского Центра Лаборатории ХИМИИ Франции в Mapcene. Desulfovibrio vulgaris Hildenborough был выделен из глинистой почвы вблизи Хильденборо, Кент (Великобритания) в 1946 году (Postgate et al., 1984). Данный штамм является модельным организмом для изучения энергетического метаболизма сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) (Heidelberg et al., 2004).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Отбор проб для выделения культур СРБ

Образцы воды для химического анализа фильтровали через стерилизующий фильтр-насадку Millipore с размером пор 0.22 мкм в стерильные полиэтиленовые флаконы объемом 50 мл. Для определения физико-химических параметров и выделения ДНК воду набирали в стерильные полиэтиленовые

бутылки объемом 5 л. Образцы воды и матов, предназначенные для культивирования, отбирали в стерильные флаконы объемом 50 мл.

Во время отбора проб измеряли температуру, pH и окислительновосстановительный потенциал воды и осадка. Для измерения использовали pHметр HANNA HI 8314F.

Физико-химические характеристики мест отбора проб приведены в главе «Результаты и обсуждение».

2.2.2. Выделение и культивирование СРБ при периодическом культивировании

Накопительные и чистые культуры СРБ получали на жидкой пресноводной среде Видделя в анаэробных условиях (Widdel, Bak, 1992). Сульфат использовали в качестве акцептора электронов. Лактат (6 мМ) или фруктозу (5 мМ) добавляли в среду как источники углерода и доноры электронов.

Приготовление питательной среды. Состав пресноводной среды Видделя (г/л): Na₂SO₄ – 4.00; KH₂PO₄ – 0.20; NH₄Cl – 0.25; NaCl – 1.00; MgCl₂*6H₂O – 0.40; KCl – 0.50; CaCl₂*2H₂O – 0.10. Среду стерилизовали автоклавированием в течение 40 минут при 121 °C.

Добавки к основной среде готовили и стерилизовали отдельно. Вносили в основную среду перед посевом в асептических условиях.

- Раствор микроэлементов: HCl (7.7 M) 12.5 мл; FeSO₄*2H₂O 2100 мг; H₃BO₃ – 30 мг; MnCl₂*4H₂O – 100 мг; CoCl₂*6H₂O – 190 мг; NiCl₂*6H₂O – 24 мг; CuCl₂*2H₂O – 2 мг; ZnSO₄*7H₂O – 144 мг; Na₂MoO₄*2H₂O – 36 мг; CaCl₂*2H₂O – 100 мг; дистиллированная вода до конечного объема 1000 мл. Раствор автоклавировали в течение 30 минут при 121 °C.
- Раствор кофакторов (мг/л): NaOH 400; Na₂SeO₃*5H₂O 6; Na₂WO₄*2H₂O – 8. Раствор автоклавировали в течение 30 минут при 121°C.

- 3. Раствор витаминов по Волину (Wolin et al., 1963) (мг/100мл): парааминобензойна кислота – 5; биотин – 1; никотиновая кислота – 2.5; кальция пантотенат – 1; пиридоксин дигидрохлорид - 15; цианкобаламин – 5; тиамин - 10; рибофлавин - 0.5; фолиевая кислота - 0.2. Готовый раствор дважды фильтровали в стерильные стеклянные бутыли, используя фильтры-насадки с диаметром пор 0.22 мкм.
- Раствор восстановителя (сульфида натрия): Na₂S*9H₂O 480 мг, дистиллированная вода до 10 мл. Раствор автоклавировали в течение 30 минут при 121 °C.
- 5. Растворы металлов:

Со (II) – CoCl_{2*6}H₂O – 2019 мг, дистиллированная вода до 50 мл;

Ni (II) – NiCl₂*6H₂O – 2050 мг, дистиллированная вода до 50 мл;

Cd (II) – CdCl₂*2.5H₂O – 1016 мг, дистиллированная вода до 50 мл;

Cu (II) – CuSO₄*5H₂O – 1960 мг, дистиллированная вода до 50 мл.

Растворы стерилизовали автоклавированием в течение 30 минут при 121 °С.

6. Растворы для корректировки рН:

- 1) NaHCO₃ 10% раствор в дистиллированной воде;
- 2) NaOH 0.1 М раствор в дистиллированной воде;
- 3) HCl 2 % раствор в дистиллированной воде;
- 4) $H_2SO_4 1M$ раствор в дистиллированной воде.

Растворы для доведения pH также стерилизовали автоклавированием в течение 30 минут при 121 °C.

Посев на жидкую среду Видделя. Перед посевом колбу с основной питательной средой кипятили и быстро охлаждали под водопроводной водой. Затем вносили добавки по протоколу (Widdel, Bak, 1992) и доводили pH до требуемого значения в асептических условиях. Готовую питательную среду разливали в стерильные пенициллиновые флаконы объемом 12 мл или в бутыли для физиологических растворов объемом 120 мл или 250 мл. Заполненные сосуды укупоривали стерильными резиновыми пробками. Пробки притирали проколом с

помощью стерильной полой иглы, таким образом, удаляли газовую фазу, содержащую кислород, и избыток жидкости. Пробки фиксировали алюминиевыми колпачками. Инокулят вносили в объеме 10% стерильным одноразовым шприцем с помощью прокола через пробку, избыток жидкости удаляли через полую иглу. Культивировали при температуре 28 °C.

Получение чистых культур. Чистые культуры получали методом в серии из 10-ти предельных разведений на жидкой среде Видделя в пенициллиновых флаконах. Если таким способом не удавалось получить чистую культуру, делали посев из последних разведений на агаровые столбики. Для этого агаризованную питательную среду Видделя расплавляли, разливали в стерильные пробирки объемом 20 мл остужали до 40 °C и вносили 1 мл инокулята. Пробирки укупоривали резиновыми пробками. Колонии выделяли из столбика агара на световом столике с помощью острых стерильных игл и переносили в пенициллиновые флаконы с жидкой питательной средой.

Чистоту выделенных культур СРБ проверяли (1) микроскопически, исследуя морфологию бактериальных клеток фазово-контрастным методом на микроскопе Zeiss AxioStar (Carl Zeiss, Германия); (2) по отсутствию роста в аэробных условиях на плотной питательной среде Plate Count Agar (на 1 литр дистиллированной воды: 1 г декстрозы, 5 г триптона и 2.5 г дрожжевого экстракта) и в анаэробных условиях на среде Anaerobic Agar (на 1 литр дистиллированной воды: 5 г казеина, 2.5 г дрожжевого экстракта и 1 г декстрозы); (3) путем разделения фрагментов гена 16S рРНК, амплифицированных из культур, в денатурирующем градиенте (ПЦР-ДГГЭ).

2.2.3. Определение пределов и оптимальных значений рН для роста СРБ

Для определения пределов роста и оптимальных значений pH чистые культуры СРБ выращивали на среде Видделя с лактатом (6 мМ) при 28 °C. pH питательной среды доводили растворами HCl (0.5M) и NaHCO₃ (1M).

Карбонатный буфер удалили из питательной среды, как было рекомендовано для культивирования чистых культур ацидофильных СРБ (Sánchez-Andrea et al., 2015).

Удельные скорости роста определяли по наклону полулогарифмического графика, полученного в экспоненциальной фазе роста. Графики роста строили по изменению количества клеток в культуральной жидкости в динамике, подсчет вели в трех повторностях.

2.2.4. Культивирование в биореакторе

Для непрерывного культивирования использовали биореактор Sartorius Biostst B plus (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Германия).

Культуральный сосуд и сифоны предварительно автоклавировали в течение 60 мин. при 121 °С. Питательную среду, приготовленную по описанной выше (п. 2.3.2) схеме, наливали в подготовленный культуральный сосуд. Растворы для корректировки pH (0.5M HCl и 1M NaHCO₃) наливали в соответствующие сифоны. Стерильный культуральный сосуд с основной питательной средой переносили в ламинарный бокс, вносили добавки и подключали сифоны с растворами для корректировки pH. Подготовленный культуральный сосуд и сифоны подключали к модулю управления, устанавливали необходимый уровень pH и продували азотом для создания бескислородных условий. pH и концентрацию кислорода отслеживали с помощью датчиков.

Электрод рН калибровали растворами Mettler Toledo (Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Датчик растворенного кислорода калибровали, используя два раствора: (1) бескислородный «нулевой» раствор для установки значения 0% и (2) предварительно прокипяченную среду Видделя для установки значения 100%. «Нулевой» раствор готовили, как описано в руководстве по эксплуатации анализатора растворенного кислорода МАРК-302Э (ВР29.00.000-01РЭ). Для этого к 250 мл 0.4 М раствора сульфита натрия (Na₂SO₃)

добавляли 5 мл 0.01 М раствора шестиводного хлорида кобальта (CoCl₂ x 6H₂O). Датчик калибровали через 10 мин.

В бутыль с инокулятом через пробку устанавливали две стерильные полые иглы разной длины. К короткой игле подключали стерилизующий фильтрнасадку, к длинной игле подключали подготовленный заранее стерильный силиконовый шланг. Шланг инокулятом ОТ емкости с подводили К культуральному сосуду, через фильтр подключали к баллону с азотом и, создавая повышенное давление в емкости с инокулятом, перекачивали инокулят в культуральный сосуд. Инокулят вносили в объеме 2.5 % от объема среды. В культивирования контролировали уровень pH. концентрацию процессе растворенного кислорода и температуру.

Начальный объем культуральной жидкости составил 1000 мл. Скорость перемешивания была 100 об/мин. Все эксперименты в биореакторе проводили при температуре 28 °C. Для создания бескислородных условий питательную среду продували азотом высокой степени очистки (99.99%) со скоростью 25 мл/мин. Далее культуральную жидкость периодически продували азотом для поддержания бескислородных условий.

Культивирование проводили, в зависимости от условий эксперимента, в полунепрерывном или непрерывном режиме. При непрерывном культивировании устанавливали постоянную скорость подачи питательной среды 13 мл/ч.

Один раз в сутки из биореактора отбирали пробы для определения концентрации сероводорода и белка. Аликвоту образца микроскопировали фазово-контрастным методом. Периодически проводили отбор проб для ПЦР-ДГГЭ анализа.

2.2.5. Определение устойчивости к металлам и получение биогенных осадков

Для изучения устойчивости СРБ к металлам их культивировали в анаэробных условиях на жидкой среде Видделя в присутствии металлов по ранее разработанной методике (Karnachuk et al., 2003). В качестве источников металлов в среду добавляли стерильные растворы хлоридов Co(II), Ni(II), Cd(II) и сульфата Cu(II). Концентрацию металлов в среде последовательно увеличивали в каждом пассаже.

Осадки, образованные под действием микроорганизмов и в контрольных условиях (без клеток СРБ), собирали центрифугированием при 5000 об/мин. в течение 10 минут на центрифуге Eppendorf 5804R (Германия). Собранный осадок высушивали при комнатной температуре и измельчали. Для длительного хранения флаконы с подготовленными осадками заполняли аргоном (99.96%) и плотно закрывали. Полученные осадки использовали для физико-химического анализа методами SEM-EDS и XRD.

2.2.6. Микроскопические методы

Трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия u элементное картирование. Микроскопические исследования подготовленных препаратов проводили с помощью электронного микроскопа "JEM-100 CXII" ("JEOL", Япония) при 80 кВ по методике, описанной Карупу (1984). Для приготовления препаратов клеток ёмкость с культурой СРБ встряхивали на вортексе 5 мин, затем содержимое перерносили в центрифужную пробирку и освобождали от крупных частиц осадка центрифугированием при 2000 об/мин в течение 1 мин. Далее супернатант переносили в чистую центрифужную пробирку и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 мин, надосадочную жидкость сливали. Далее препараты готовили, как описано Уикли (1975). Для этого клетки фиксировали 2.5% раствором глютарового альдегида в 0.1 М какодилатном буфере (рН 7.4), после чего обрабатывали 1% раствором четырехокиси осмия и двукратно промывали какодилатным буфером. Затем материал дегидратировали в растворах этилового спирта с восходящей концентрацией. Обезвоженные препараты заливали смесью смол Embed 812 (Epon-812) (Undeen, 1997). Полимеризацию проводили при 60 °С в течение 2 суток. Срезы препаратов толщиной 60 – 100 нм готовили с помощью микротома Ultrotome III ("LKB",

Швеция). Затем срезы переносили на формваровые сетки-подложки и окрашивали 2% раствором уранилацетата в 50% этиловом спирте в течении 10-20 мин при 37 °C, а затем цитратом свинца при комнатной температуре от 3 до 10 мин (Reynolds, 1963).

Световая микроскопия. Микроскопический анализ и подсчет клеток СРБ проводили фазово-контрастным методом с помощью микроскопа Axio Star (Carl Zeiss, Германия). Микрофотографии получали с помощью микроскопа Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) с цифровой камерой Axio Cam HRc и программным обеспечением Axio Vision. Для подсчета клеток брали аликвоту культуральной жидкости в объеме 2 мкл переносили на предметное стекло и накрывали покровным стеклом размером 18 х 18 мм. Подсчет клеток в 1 мл использовали формулу:

$$x = \frac{1000}{S_{\Pi 3} * \frac{V_{\Pi p}}{S_{CT}}} * n$$

где:

х – количество клеток в 1 мл исследуемой пробы;

 S_{III} – площадь поля зрения микроскопа (1.43 мм²);

 S_{ct} – площадь покровного стекла (324 мм²);

V_{пр} – объем пробы взятой для анализа (2 мкл);

n – среднее количество клеток в поле зрения (по 30 измерениям).

2.2.7. Молекулярно-биологические методы

Выделение ДНК. Для выделения ДНК клетки из накопительных и чистых культур собирали центрифугированием в течение 30 мин при 5000 об/мин. в центрифуге с охлаждением Eppendorf 5804R. Тотальную ДНК из культур СРБ выделяли с использованием набора МО BIO Power Soil DNA Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) в соответствии с рекомендациями производителя.

Полимеразная иепная реакция. Амплификацию гена 16S рРНК проводили с помощью пары праймеров 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (DeLong, 1992; Weisburg et al., 1991), как было описано ранее (Karnachuk et al., 2009). Для подготовки образцов к разделению в денатурирующем градиенте проводили реамплификацию фрагментов гена (около 600 п.н.) с праймерами BacV3f (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') и 907R (5'-СССТСААТТСМТТТСАСТТТ-3') (Weisburg et al., 1991). При этом праймер **GC**-последовательность 5'-конце. ПЦР-продукты, BacV3f содержал на полученные с праймерами 27F и 1492R и разведенные до концентрации ДНК около 50 нг/мкл, использовали качестве матрицы ДНК во второй реакции. ПЦРсмесь (объемом 50 мкл) содержала 5 мкл 10хТаq-буфера (Fermentas, Литва), 2.5 мМ MgCl₂ (Fermentas, Литва), 100 мкМ смеси dNTP (Fermentas, Литва), 1.25 ед. рекомбинантной Таq ДНК-полимеразы (Fermentas, Литва), 0.2 мкМ каждого праймера (ЗАО «Синтол», Москва). Реакцию проводили в амплификаторе MyCycler (BioRad). В качестве положительного контроля использовали ДНК, которая амплифицировалась. реакционную смесь с ранее удачно Отрицательным контролем была реакционная смесь, не содержащая ДНК.

Визуализацию продуктов амплификации осуществляли в 1% агарозном геле с использованием горизонтальной камеры для электрофореза Mini-Sub Cell GT System (BioRad. Образцы окрашивали бромистым этидием, который добавляли в гель в концентрации 0.5 мг/л.

Разделение фрагментов гена 16S рРНК в денатурирующих условиях (ПЦР-ДГГЭ). Для детекции доминирующих филотипов в накопительных культурах и для проверки чистоты полученных изолятов СРБ применяли разделение фрагментов гена 16S рРНК в денатурирующем градиентнрм гель-электрофорезе. Фрагменты разделяли, используя систему Dcode System (Biorad laboratories, Hercules, CA, США) в 8 % полиакриламидном геле с градиентом 40 – 60 %. 100 % раствор с денатурирующими свойствами содержал формамид в концентрации 40% и мочевину - 7М. В качестве полимеризующих агентов добавляли ТЕМЕD и APS. Для промывки лунок перед внесением образцов ДНК использовали охлажденный до 4 °C TAE-буфер. Электрофорез проводили в TAE-буфере при 60°C и 120 В в течение 17.5 часов.

Отдельные полосы вырезали на трансиллюминаторе ECX-26MX (Vilber Lourmat, Франция) при длине волны 312 нм. Вырезанные полосы промывали деионизированной водой, а затем термостатировали 12 часов при 4 °C в 30 мкм стерильной ЛНК. После деионизированной ДЛЯ извлечения воды амплифицировали с праймерами BacV3f и 907R и коммерчески секвенировали в ЗАО «Синтол», г. Москва. Последовательности анализировали с использованием программного пакета BioEdit И инструмента **BLAST** GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) (Altschul et al., 1997).

2.2.8. Филогенетический анализ

Филогенетический анализ последовательностей гена 16S рРНК проводили методом ближайшего соседа с использованием программного обеспечения ARB (Ludwig et al., 2004). Чтобы определить порядок ветвления, бутстреп-анализ был выполнен с использованием 1000 альтернативных деревьев.

2.2.9. Аналитические методы исследования

Химический анализ проб воды и культуральной жидкости. Количественное содержание элементов в пробах шахтных отходов Shg-14-4 и Shg-14-5 и в образцах культуральной жидкости определяли с использованием метода массспектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS). Пробы культуральной жидкости анализировали в химико-аналитическом центре «Плазма» (г. Томск). Химический состав природных проб был проанализирован на базе Университета Глазго (Великобритания). Концентрации основных анионов были определены с помощью ионной хроматографии. Спектральный анализ для определения цитохромов. Для получения спектров поглощения клеток чистые культуры *Desulfovibrio* spp. выращивали в объеме 500 мл. Клетки осаждали центрифугированием в течение 20 мин. при 7000 об/мин., 4 °C, используя прибор Sorvall Plus (Thermo Fisher Scientific, США). Далее супернатант сливали, а клетки переносили в пластиковую центрифужную пробирку объемом 50 мл и добавляли 45 мл предварительно насыщенного азотом и охлажденного до температуры 4 °C буферного раствора, содержащего 100 мМ Tris-HCl и 150 мМ NaCl.

Далее пробирку встряхивали для равномерного распределения клеток по объему буферного раствора и центрифугировали в центрифуге Eppendorf 5430 (Eppendorf, Германия) в течение 20 минут при 7000 об/мин при 4 °C. Операцию повторяли до полного исчезновения запаха сероводорода.

После центрифугирования к отмытым клеткам добавляли 3-4 мл буферного раствора, взбалтывали и помещали в гомогенезатор Поттера. Гомогенезировали до полного исчезновения комков, но не менее 20 раз. Все манипуляции проводили на льду. Для удаления осадка полученную суспензию переносили в центрифужные пробирки объемом 2 мл и центрифугировали в течение 5 минут при 2000 об/мин. при 4 °C, используя прибор Eppendorf 5430 (Eppendorf, Германия). Супернатант аккуратно переносили в чистую емкость и хранили до анализа при 4 °C не более нескольких часов. Для пересчета концентрации цитохромов определяли концентрацию белка по Бредфорду.

Исследование по определению цитохромов проводили на спектрофотометре SLM Aminco[™] DW-2000 UV-VIS (производитель) в диапазоне длин волн 500 нм – 650 нм, используя кварцевые кюветы объемом 1 мл. В две кюветы помещали по 0.8 мл суспензии клеток, в третью кювету наливали буфер.

В ходе эксперимента в одну кювету, содержащую суспензию клеток, добавляли небольшое количество аскорбиновой кислоты и гидросульфита натрия. Во вторую кювету добавляли феррицианида калия. Показания оптической плотности снимали для суспензии клеток с аскорбиновой кислотой с добавлением гидросульфита натрия против суспензии клеток с добавлением феррицианида 49 калия. Количество фермента рассчитывали на основе данных спектрограмм и концентрации белка.

Исследование восстановления кислорода клетками Desulfovibrio. Исследование проводили с помощью оксиграфа Gilson Medical Electronics (США) при 28 °C. pH стабилизировали добавлением буфера, содержащего 100 мМ Tris-HCl и 150 мМ NaCl. В эксперименте использовали термостатируемую кювету, установленную на магнитной мешалке.

Кювету заполняли буферным раствором, затем хроматографическим шприцем вносили 100 мкл суспензии клеток и плотно закрывали. После стабилизации показаний вносили исследуемый органический субстрат. Тестировали восстановление кислорода в присутствии нескольких доноров электронов, добавляя порциями растворы 3 мМ NADH, 200 мМ лактат, 10% глицерол, 10% этанол, 10% пептон. В боковой ход кюветы был установлен электрод для измерения содержания растворенного кислорода. Данные с электрода фиксировались на миллиметровой бумаге с помощью самописца. Для проверки способности клеток использовать водород В качестве донора электронов, содержимое кюветы насыщали газообразным водородом, затем шприцем вносили небольшой объем воздуха, кювету закрывали и проводили измерение.

Скорость потребления рассчитывали по крутизне наклона линии, количеству белка, концентрации донора электронов.

Тестирование способности штаммов Desulfovibrio к росту в присутствии кислорода. Культуры СРБ в стационарной фазе роста вносили в пробирки Хангейта со средой Постгейта (Postgate, 1984), содержащей 6 мМ лактат, в количестве 10% от общего объема. Эксперимент проводили при 28 °C по схеме, описанной Рамель с соавторами (Ramel et al., 2015). Для каждого штамма использовали 3 пробирки, в две из которых устанавливали иглы. Длинную иглу опускали до дна пробирки, подключая подачу газа через стерилизующий фильтр-насадку. С помощью второй (короткой) иглы снижали избыточное давление в

50

пробирке. В одну пробирку подавали газовую смесь, содержащий 0.01% кислорода и 99.99% азота. Газовую смесь готовили с помощью смесителя газов PEGAS 4000 MF (Columbus Instruments, CША). Вторую пробирку продували азотом. Третью пробирку использовали в качестве контроля.

Концентрацию растворенного кислорода измеряли с помощью регистратора Mettler Toledo M700 (Mettler Toledo, США), оснащенного модулем для измерения концентрации O₂ ppb 4700 и полярографическим сенсором растворенного кислорода InPro 6900. Оптическую плотность измеряли с помощью лабораторного цифрового колориметра Biochrom WPA CO7000 (Biochrom, CША) при длине волны 600 нм.

Определение концентрации белка по методу Бредфорда. За основу брали модифицированный метод Бредфорда, как было описано paнee (Lamrabet et al., 2011). В пластиковые пробирки объемом 1.5-2.0 мл разливали по 10 мкм 10 М раствора NaOH и добавляли по 90 мкм опытного раствора суспензии клеток. Для каждого образца готовили три разведения с разным соотношением образец: дистиллированная вода (5:85 мкл, 15:75 мкл и 30:60 мкл). В контрольную пробирку добавляли 90 мкл дистиллированной воды. Готовую смесь с конечным объемом 100 мкл перемешивали на вортексе и выдерживали 15 мин. Далее в каждую пробирку добавляли по 1 мл реактива Бредфорда (Quick Start[™] Bradford 1x Dye Reagent #5000205, Bio Rad), перемешивали на вортексе и измеряли оптическую плотность при длине волны 595 нм. Коцентрацию белка определяли по калибровочному графику, который строили при каждом измерении. Для этого использовали 0.1 % раствор бычьего сывороточного альбумина, который добавляли к 10 мкл 10 H раствора NaOH. Использовали следующие разведения 0.1 % раствора альбумина в дистиллированной воде: 0:90 мкл, 10:80 мкл, 20:70 мкл, 40:50 мкл, 60:30 мкл и 80:10 мкл. На основе показании оптической плотности для каждого разведения строили калибровочный график.

Определение концентрации белка по методу Лоури (Lowry et al., 1951). 1 мл культуральной жидкости помещали в стеклянную пробирку, добавляли 5 мл раствора NaOH и термостатировали на водяной бане 30 мин. Перемещали содержимое в центрифужные пробирки на 10 мл и центрифугировали 15 мин при 7500 об/мин. 0.5 мл супернатанта перемещали в сухую и чистую стеклянную пробирку и добавляли 2.5 мл раствора С. Встряхивали содержимое. Через 10 мин добавляли 0.1 мл реактива Фолина, встряхивали. Через 30 минут измеряли оптическую плотность при длине волны 750 нм.

Концентрацию белка рассчитывали по формуле:

$$\mathbf{x} = (\mathbf{a} - \mathbf{b}) \ast \mathbf{k},$$

где а – оптическая плотность в образце, b – оптическая плотность в контроле, k - коэффициент, рассчитанный с помощью калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой использовали растворы бычьего сывороточного альбумина с известной концентрацией.

Растворы и реактивы:

0.5 М NaOH: NaOH – 4 г, дистиллированная вода – 200 мл.

Раствор А: Na₂CO₃ – 10 г, дистиллированная вода до 500 мл.

Реактив В: CuSo₄*5H₂O – 0.5 г; цитрат Na – 1 г, дистиллированная вода до 100 мл.

Реактив С: 50 мл реактива А + 1 мл реактива В.

Реактив: раствор Фолина (Merck) разбавляли в 2 раза дистиллированной водой непосредственно перед внесением.

Определение концентрации сероводорода. Для определения концентрации сероводорода использовали колориметрический метод с N,Nдиметилпарафенилендиамином (Cline, 1969).

В мерную колбу на 25 мл вносили 5 мл раствора ацетата цинка, добавляли 1 мл исследуемого раствора, далее добавляли 5 мл дистиллированной воды и 2.5 мл диамминового реактива. Хорошо перемешивали и добавляли 0.125 мл железоаммонийных квасцов, перемешивали. Оставляли в темном месте на 15 мин. Затем доводили объем дистиллированной водой до 25 мл, перемешивали и измеряли оптическую плотность при длине волны 600 нм. В контроль, вместо

исследуемого раствора, вносили дистиллированную воду. Концентрацию сероводорода рассчитывали по формуле:

$$\mathbf{x} = (\mathbf{a} - \mathbf{b}) \ast \mathbf{k},$$

где а – оптическая плотность в образце, b – оптическая плотность в контроле, k - коэффициент, рассчитанный с помощью калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой использовали растворы сульфида натрия (Na₂S*9H₂O) известной концентрации.

Растворы и реактивы:

Раствор уксуснокислого цинка: Zn(CH₃COO)2*2H₂O –24 г, 20% уксусная кислота – 1 мл, дистиллированная вода до 1 л.

Диаминовый реактив: дистиллированная вода – 600 мл, серная кислота 98% – 200 мл, N,N-диметил-1,4-фенилендиаммоний хлорид – 2 г, дистиллированная вода до 1 л.

Раствор железоаммонийных квасцов: NH₄Fe(SO₄)*12H₂O – 10 г, серная кислота 98% – 2 мл, дистиллированная вода до 1 л.

Сканирующая электронная микроскопия с энергодисперсионным анализом и элементное картирование. Микрофотографии и элементный анализ осадков, полученных в результате культивирования СРБ в присутствии металлов, получали с использованием сканирующего электронного микроскопа Philips SEM 515 (Philips Export BV, Amsterdam, Нидерланды), оборудованного микрозондом для элементарного анализа, как описано ранее (Ikkert et al., 2013). А также с использованием 3D-сканирующего электронного микроскопа Quanta 200 (FEI Company, Hillsboro, США) с интегрированной системой для энергодисперсионного анализа.

Распределение элементов в бактериальных клетках для подготовки элементных карт устанавливали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 (JEOL), оснащенного детектором для элементного картирования X-Max EDS (Oxford Instruments, Abingdon, Великобритания).

Пробоподготовку проводили как описано в разделе 2.2.6. Ультратонкие срезы готовили с помощью ультрамикротома Leica UC7 (Leica Microsystems, Vienna, Австрия).

Рентгенофазовый анализ (XRD). Состав кристаллических фаз в осадках, полученных в результате культивирования СРБ в присутствии металлов и в химических контролях, исследовали с помощью дифрактометра Shimadzu XRD 6000 (Shimadzu, Япония) с рентгенофазовым анализом. Данные анализа обрабатывали в программном обеспечении Crystallographica-Search Match и базы данных PDF-4 (International Center Diffraction Data, http://www.icdd.com).

2.2.10. Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных был выполнен с помощью пакетов программного обеспечения MS Excel 2007 и OriginPro 2015.

ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Физико-химическая характеристика проб отходов добычи металлов

Результаты исследования физико-химических параметров проб представлены в таблице 1. Температура воды из шурфа ShG-14-1 составляла 2.58 °C, pH 6.6, Eh + 494 мВ. Элементный анализ (ICP-MS) показал присутствие в пробе повышенных концентраций алюминия (471 мг/л), марганца (734 мг/л), железа (1898 мг/л), меди (80.9 мг/л), цинка (3597 мг/л), кадмия (16 мг/л) и мышьяка (48 мг/л) (таблица 2). Также выявили присутствие в значительных количествах редкоземельных элементов за исключением прометия и скандия, большее количество приходилось на иттрий (6.5 мг/л), церий (6.2 мг/л), лантан (2.94 мг/л) и неодим (2.7 мг/л).

Температура воды в месте отбора пробы ShG14-4 составляла 9.7 °C, pH 6.7 и Eh +258 мВ (таблица 1). В пробе обнаружили высокое содержание сульфата (400 мг/л), продукта окисления остаточных сульфидов. Присутствие растворенных сульфатов свидетельствуют о развитых процессах окисления сульфидных минералов.

Температура воды на выходе из шахты ShG14-5 была 2.8 °C, pH 7.15 и Eh +271 мВ. Анализ геохимических показателей пробы воды также выявил присутствие сульфат иона, концентрация которого достигала 223 мг/л (таблица 2). Несмотря на развитые процессы окисления, рН воды оставался нейтральным, что связано с присутствием карбонатов во вмещающих породах, нейтрализующих протоны, образующиеся при окислении сульфидов. Вода из проб ShG14-4 и ShG14-5 имеет тип Ca-(Mg)-SO₄, что подтверждает присутствие карбонатов кальция и магния. Элементный анализ так же подтвердил присутствие этих катионов в пробах воды. Несмотря на наличие пирита в хвостохранилище, концентрация железа в пробах ShG14-4 и ShG14-5 была не велика и составляла 78 мкг/л и 141 мкг/л, соответственно, это обстоятельство можно объяснить окислительно-восстановительными условиями -ПО мере увеличения Eh

55

растворенное двухвалентное железо окисляется и выпадает в осадок (Banks, 2014).

Таблица 1. Физико-химические характеристики мест отбора проб, использованных для выделения СРБ

Название	Координаты	Дата отбора	Описание	pН	Τ,	Eh
пробы				воды	°C	воды,
						mV
ShG-14-1	50°33'22.2''N	27.07.2014	Вода со дна шурфа для	2.58	6.6	+494
	116°16'55.8"E		закладки взрывчатки в			
			заброшенном карьере по			
			добычи			
			полиметаллических руд.			
			Глубина шурфа 7.5 м.			
			Цвет воды –			
			интенсивный оранжево-			
	51000151 1WD T		красный.	-	- -	
ShG -14-4	51°03'51.1"N	29.07.2014	Высачивания из-под	6.7	9.7	+ 258
	117°46'36.1"E		дамбы			
			хвостохранилища			
			отходов со следами			
			окисления железа			
			оранжевого цвета.			
			Железистые стримеры			
~ ~ ~ ~ ~ ~			оранжевые и зелёные.		• •	
ShG -14-5	51°04'01.6"N	29.07.2014	Заброшенный	7.15	2.8	+ 271
	117°46'17.2"E		горизонтальный выход			
			из шахты. Массовые			
			обрастания на			
			прогнивших			
			деревянных опорах			
			толщиной 2.5-3 мм.			

Выбраные для исследования пробы имели характерные для КШД признаки: низкий pH, высокие концентрации металлов и сульфата (Kim and Chon, 2001; Grande et al., 2005; Neculita et al., 2007). Окисленные условия должны были ингибировать развитие анаэробных СРБ, но из литературных данных известно, многие микроорганизмы этой группы имеют механизмы что защиты от Это окислительного стресса. позволяет им существовать В присутствии небольших концентраций кислорода или временно переносить неблагоприятные условия (Cypionka et al., 1985; Abdollahi & Wimpenny, 1990; Lamrabet et al., 2011).

Таблица 2. Элементный состав воды в местах отбора проб, определенный с помощью масс-спектрального анализа с индуктивно связанной плазмой

Рашаатра	Название пробы					
Бещество	ShG-14-1	ShG-14-4	ShG-14-5			
1	2	3	4			
Анионы, мг/л						
Cl	<50	0.76	0.57			
SO_4^{2-}	15990	400	223			
Br	<30	<0.01	< 0.01			
HPO ₄ ²⁻	<10	<0.01	< 0.01			
F	13	0.64	0.39			
Катионы и основные металлы, мг/л						
Ca	<855	188.0	135.8			
Mg	381	33.05	33.64			
Na	<1000	4.7	2.9			
K	<135	2.2	1.0			
Al	471	< 0.002	0.005			
Fe	1898	0.078	0.141			
Mn	734	0.220	0.178			
Cu	80.9	0.0011	0.0006			
Zn	3597	0.534	2.723			
	S, Si,	Р, мг/л				
Р	13	<0.01	< 0.01			
S	4410	150	90			
Si	<63.3	7.380	7.754			
	Микроэле	менты, мг/л				
Ag	<0.225	< 0.0002	< 0.0002			
As	48.282	0.059	0.0528			
В	<32.5	0.083	0.064			
Ba	< 0.100	0.030	0.0084			
Be	0.563	< 0.00002	0.0001			
Cd	16.023	0.002	0.00396			
Cr	0.120	< 0.00009	<0.00009			
Со	2.596	0.00005	0.0008			
Cs	0.010	0.0003	0.0007			
Ga	< 0.665	<0.0006	< 0.0006			
Hf	0.007	< 0.00001	< 0.00001			
Li	<7.250	0.013	0.013			
Мо	0.229	0.005	0.00193			
Nb	< 0.005	< 0.00002	< 0.00002			
Ni	3.467	0.0014	0.0072			
Pb	0.349	0.00042	0.0007			
Rb	0.032	0.0027	0.00274			
Sb	0.013	0.0032	0.00542			
Se	<0.330	0.0003	0.0025			
Sn	<0.280	<0.0003	< 0.0003			
Sr	0.666	0.812	0.508			

Окончание Таблицы 2.

1	2	3	4	
Та	< 0.004	< 0.00002	< 0.00002	
Ti	< 0.150	< 0.0002	< 0.0002	
Th	2.328	< 0.00005	< 0.00005	
Tl	< 0.022	< 0.00002	0.00002	
U	2.287	0.0088	0.00376	
V	<1.210	< 0.002	< 0.002	
W	< 0.175	< 0.0002	< 0.0002	
Zr	0.437	< 0.0002	< 0.0002	
Редкоземельные элементы, мг/л				
Y	6.499	0.0003	0.0006	
La	2.694	0.0032	0.00009	
Ce	6.177	0.00002	0.0002	
Pr	0.752	0.00002	0.00002	
Nd	2.728	< 0.00001	0.00008	
Sm	0.668	0.00001	0.00003	
Eu	0.087	0.00001	0.00001	
Tb	0.144	< 0.00001	0.00001	
Gd	0.790	0.00002	0.00005	
Dy	0.910	0.00002	0.00006	
Но	0.205	0.00001	0.00002	
Er	0.634	0.00002	0.00005	
Tm	0.087	0.00001	0.008	
Yb	0.589	0.00003	0.00004	
Lu	0.082	0.00001	0.00007	

3.2. Получение накопительных и чистых культур СРБ

Из всех трех отобранных проб были получены накопительные культуры с признаками сульфидогенеза (таблица 3).

Посев воды из пробы ShG-14-1 с использованием различных доноров при начальном pH 2.5 не привел к получению культур, образующих сероводород. Сульфидогенный рост был получен только после концентрации клеток из 50 мл пробы путем фильтрования через мембранный фильтр (диаметр пор 0.2 мкм). Образование сероводорода обнаружили на среде с фруктозой. pH пробы ShG-14-1 был равен 2.5, что должно благоприятствовать развитию ацидотолерантных форм.

Таблица 3. Доминирующие филотипы выявленные в полученных накопительных культурах методом ПЦР-ДГГЭ

Название	рН	Субстрат	Доминирующие филотипы определенные
накопительной			методом ПЦР-ДГГЭ*
культуры			
	2.5	Фруктоза	Bacteroides dorei, 100
ShG-14-1			Desulfosporosinus meridiei, 99 **
			Desulfurispora thermophila, 91
ShG 14 4	5.2	Этанол	Clostridium beijerinckii, 99
5110-14-4			Desulfovibrio mexicanus, 98
ShC 14 5	5.5	Лактат	Paludibacter propionicigenes, 97
5110-14-3			Desulfovibrio mexicanus, 98-99

*ближайший валидно описанный родственник, % сходства частичной последовательности (600 п.н.) гена 16S рРНК

**полужирным шрифтом выделены организмы с известной способностью к диссимиляционной сульфатредукции

Полученная накопительная культура на среде с фруктозой была обозначена ShG-14-1. Культура была представлена палочковидными подвижными клетками длинной 2-5 мкм, некоторые клетки содержали споры. ПЦР-ДГГЭ анализ накопительной культуры ShG-14-1 показал, что ближайшими родственниками доминирующих филотипов СРБ являются спорообразующие *Desulfurispora thermophila* (91 % сходства) и *Desulfosporosinus meridiei* (99 % сходства) (таблица 3). Также в культуре присутствовал представитель класса *Bacteroidia, Bacteroides dorei* для которого не известна способность к восстановлению сульфата. Прогрев накопительной культуры ShG-14-1 при 85°C в течение 30 минут и последующая серия разведений на среде с фруктозой позволили выделить морфологически однородный изолят, который обозначили как штамм NP. Штамм NP представлен подвижными, слегка изогнутыми палочками с округлыми концами размером 2.5-4 х 1 мкм, одиночными или в парах. Иногда встречаются клетки с паратерминальными спорами (рис. 8).



Рис. 8. Микрофотографии *Desulfosporosinus* sp NP на среде с фруктозой (А) фазовоконтрастная микроскопия, размер линейки 5 мкм и (Б) просвечивающая электронная микроскопия, ультратонкий срез, размер линейки 1 мкм.

Филогенетический анализ последовательности гена 16S рРНК близкой к полной (1446 п.н.), отнес выделенный штамм к семейству Peptococcaceae, роду *Desulfosporosinus* (рис. 9). Последовательность гена 16S рРНК штамма *Desulfosporosinus* sp. NP имела сходство 97 % с четырьмя валидно описанными видами рода *Desulfosporosinus – D. meridiei*, *D. orientis*, *D. auripigmenti* и *D. acidiphilus*. Бактерии рода *Desulfosporosinus* являются характерным компонентом микробных сообществ в экосистемах с низкими значениями рН (Alazard et al., 2010; Abicht et al., 2011; Sanchez-Andrea et al., 2015). Большая часть полученных к настоящему времени ацидофильных изолятов СРБ относится к этому роду (Sanchez-Andrea et al., 2015; Kарначук и др., 2015; Mardanov et al., 2016).

Пробу ShG-14-4 культивировали при кислых (2.5) и слабокислых (4.7-5.5) начальных значениях pH с добавлением органических субстратов, лактата, этанола, глицерина, ацетата, фруктозы и пептона. Образование сероводорода было обнаружено на среде с лактатом и этанолом при pH 5.0-5.2. Обе культуры были представлены морфологически различными палочками и вибрионами.

Филогенетический анализ секвенированных последовательностей гена 16S pPHK, полученных методом ПЦР-ДГГЭ показал, что в накопительной культуре ShG-14-4 присутствовал один доминирующий СРБ-филотип родственный *Desulfovibrio mexicanus*. Из накопительной культуры ShG-14-4 на среде с этанолом был выделен морфологически однородный изолят.



0.02

Рис. 9. Филогенетическое дерево генов 16S рРНК, построенное методом ближайшего соседа (neighbor-joining) и показывающее положение штамма *Desulfosporosinus* sp. NP и филотипов *Desulfosporosinus*, определенных методом ПЦР-ДГГЭ. Узлы дерева, обозначенные кружками, характеризуются значениями бутстреппинга выше 70 %. Масштаб соответствует 2 заменам на каждые 100 нуклеотидов.

Для получения чистого изолята высевали культуру ShG-14-4 на твёрдую среду для получения колоний. После зарастания выделенных колоний проводили серию последовательных разведений на среде с этанолом. Полученная морфологически однородная культура была обозначена как штамм DV. Изолят

представлен подвижными вибрионами, одиночными или в парах, размером 2.5-3 х 1 мкм была обозначена как штамм DV (рис. 10).



Рис. 10. Микрофотографии *Desulfovibrio* sp. DV на среде с лактатом (А) фазовоконтрастная микроскопия, размер линейки 5 мкм и (Б) просвечивающая электронная микроскопия, ультратонкий срез, размер линейки 1 мкм.

Филогенетический анализ близкой к полной последовательности гена 16S pPHK (1428 п.н.) показал, что штамм DV относится к классу Deltaproteobacteria, семейства Desulfovibrionacea, род *Desulfovibrio*, а его ближайшим родственником является *Desulfovibrio magneticus* RS-1 со сходством последовательностей 98.5% (рис. 11). Обе пробы, ShG-14-4 и ShG-14-5, характеризовались слабокислыми условиями (pH 5.2-5.5), при которых могут существовать представители дельтапротеобактерий. СРБ рода *Desulfovibrio* обычно легко культивируются, поэтому, доминирование их в накопительных культурах с обозначимым диапазоном pH было ожидаемым.

Фрагмент мата ShG-14-5 был использован в качестве инокулята для культивирования на среде с лактатом. Была получена накопительная культура с признаками сульфидогенеза при pH 4.0-5.5. Морфологически культура была представлена различными палочками и вибрионами. Определение доминирующих филотипов методом ПЦР-ДГГЭ выявило несколько организмов, являющихся родственниками *D. mexicanus*. Накопительная культура ShG-14-5 была использована в качестве инокулята для эксперимента в биореакторе.



Рис. 11. Филогенетическое дерево генов 16S рРНК, построенное методом ближайшего соседа (neighbor-joining) и показывающее положение штаммов ED, VK, DV и филотипов *Desulfovibrio*, определенных методом ПЦР-ДГГЭ.

3.3. Получение чистых культур путем создания градиента рН в биореакторе

В качестве инокулята для биореактора использовали накопительную культуру ShG-14-5, полученную на среде с лактатом. Из среды Видделя, использованной для культивирования в биореакторе, удаляли карбонатный буфер, в соответствии с рекомендациями для выращивания ацидофильных СРБ (Sanches-Andrea et.al. 2012). После инокуляции, начальный рН в биореакторе установили на уровне 4.6. Для выявления доминирующих филотипов и выделения чистой культуры СРБ из биореактора ежедневно отбирали образцы культуральной жидкости. При отборе проб измеряли концентрацию белка, сероводорода, а также наблюдали под фазово-контрастным микроскопом.

Ранее проведенный анализ доминирующих филотипов в сульфидогенных накопительных культурах, полученных из проб с разными значениями pH, позволил сделать предположение, что изменение pH при культивировании консорциума СРБ может привести к доминированию одного представителя, для которого данные условия оптимальны. В этом случае с помощью последующих манипуляций можно выделить этого представителя в чистую культуру.

На рисунке 12 показано изменение pH, концентраций белка и сероводорода в процессе культивирования и отмечены точки, в которых определяли доминирующие филотипы методом ПЦР-ДГГЭ. Решение о необходимости молекулярного анализа принимали на основании результатов микроскопирования и данных о концентрации белка и сероводорода. В процессе культивирования происходило постепенное повышение pH среды. Увеличение концентрации белка и сероводорода не происходило до тех пор, пока pH не достиг 5.7 после 357 часов культивирования. Из рисунка 13 видно, что в этот момент, помимо сульфатредукторов, в биореакторе присутствовали филотипы, отличные от СРБ. В этой точке было определено наибольшее разнообразие филотипов методом ПЦР-ДГГЭ, при этом pH соответствовал значению в исходной пробе (5.5). В точке 212 часов, когда pH был на уровне 5.3, в культуральной жидкости доминировали крупные изогнутые подвижные палочки. ПЦР-ДГГЭ анализ показал, что сульфатредуцирующие члены сообщества были родственниками *Desulfovibrio carbinoliphilus, Desulfovibrio aerotolerans* и *D. mexicanus* (рис. 13).



Рис. 12. Изменение pH, концентрации белка и H2S в биореакторе в процессе культивирования. Точки отбора проб и соответствующие значения pH показаны стрелками. Концентрации белка и H2S измерял в трех повторностях. Вертикальные линии показывают стандартное отклонение.

Также были обнаружены представители Epsilonproteobacteria представленные родственником *Sulfurospirillum multivorans* и представитель Actinobacteria относящийся к роду *Terrabacter – Terrabacter terrae*. ПЦР-ДГГЭ анализ показал, что в точке 357 часов доминирующими филотипами были родственники *D. mexicanus* и *Desulfovibrio idahonensis*. Также в биореакторе

присутствовали не-СРБ филотипы – S. multivorans, Acinetobacter calcoaceticus и Acinetobacter pittii.



Рис. 13. Доминирующие филотипы бактерий, выявленные методом ПЦР-ДГГЭ в биореакторе и исходной накопительной культуре. Филотипы, для которых не известна способность к диссимиляционной сульфатредукции, выделены серым цветом. Цифрами показан процент сходства фрагмента гена 16S рРНК ближайшим валидно описанным представителем.

Заметное увеличение концентрации белка и сероводорода до 64 мг/л и 133 мг/л, соответственно, наблюдали через 474 часа, когда pH в биореакторе достиг 7.4. После того, как концентрация биомассы достигла значительной величины, в точке 498 часов (pH 7.8) было принято решение о постепенном снижении pH. Снижение pH привело к значительному росту сообщества. В точке 642 часа

концентрация белка достигла 718 мг/л и концентрация сероводорода 514 мг/л, pH среды в этой точке составлял 7.3. В этой точке доминировал один СРБ-филотип - родственник *Desulfovibrio arcticus*. Филотипы, родственные *S. multivorans* и *A. calcoaceticus*, также присутствовали в биореакторе.

Дальнейшее снижение pH привело к снижению роста. В точке 1193 часа, где pH составлял 5.3 концентрация белка 128 мг/л и сероводорода - 63 мг/л. Несмотря на дальнейшее снижение pH, в точке 1299 часов (pH 5.2) наблюдали увеличение биомассы до 134 мг/л и сероводорода до 76 мг/л. Доминирующими филотипами были родственники *D. mexicanus*, а также *T. terrae*. Биореактор был остановлен после 1817 часов культивирования, когда pH снизился до 3.7 и произошел лизис клеток.

Все выявленные нами филотипы для которых известна способность к сульфатредукции относились к роду *Desulfovibrio* (рис. 11). СРБ-филотипы относились к двум группам: *D. aerotolerans – D. carbinophilus – Desulfovibrio magneticus* и *D. idahonensis – D. mexicanus*. *D. mexicanus*, наиболее устойчивый компонент в консорциуме биореактора, был обнаружен почти во всех отобранных пробах. Родственные *D. mexicanus* филотипы доминировали в исходной накопительной культуре (рис. 13).

Так же в консорциуме из биореактора были определены филотипы для которых способность к сульфатному дыханию не известна, включая *Cupriavidus basilensis* (Betaproteobacteria), *S. multivorans* (Epsilonproteobacteria), *T. terrae* (Actinobacteria). Близкие к *Acinetobacter* (Gammaproteobacteria) филотипы были обнаружены при рН 5.7, *Cellulomonas persica* (Actinobacteria) наблюдали только при рН 4.7. В исходной накопительной культуре из несульфатредуцирующих филотипов доминировали родственники *Paludibacter propionicigenes* (Bacteroidetes), однако, их не обнаруживали в пробах при культивировании в биореакторе.

Серия разведений на среде с лактатом из пробы 212 часов позволила получить морфологически чистую культуру, обозначенную штамм VK. Штамм

представлен подвижными вибрионами, одиночными или в парах, размером 2.5-3 х 1 мкм (рис. 14).



Рис. 14. Микрофотографии *Desulfovibrio* sp VK на среде с лактатом (А) фазовоконтрастная микроскопия, размер линейки 5 мкм и (Б) просвечивающая электронная микроскопия, ультратонкий срез, размер линейки 1 мкм.

Последовательность гена 16S рРНК штамма VK, близкая к полной (1427 п.н.), была амплифиципрована и секвенирована. Филогенетический анализ последовательности помещает изолят в класс *Deltaproteobacteria*, семейство Desulfovibrionacea, род *Desulfovibrio*. Ближайший родственник штамма VK *D*. *carbinoliphilus* со сходством последовательности гена 16S рРНК 98.8%. *Desulfovibrio* sp. штамм VK относится к группе *D. aerotolerans – D. carbinophilus – D. magneticus* (рис. 11).

Посев пробы 357 часов (pH 5.7) из биореактора на модифицированную пресноводную среду Видделя с лактатом и сульфатом меди (II) в концентрации 1.5 мМ и дальнейшие серии разведений на среде с лактатом позволили получить однородную по морфологическим признакам чистую культуру, обозначенную штамм ED. Штамм представлен подвижными вибрионами, в парах или в цепочках. Размер клеток 1-1.5 х 0.3-0.5 мкм (рис. 15).



Рис. 15. Микрофотографии *Desulfovibrio* sp. ED на среде с лактатом (А) фазово-контрастная микроскопия, размер линейки 5 мкм и (Б) просвечивающая электронная микроскопия, ультратонкий срез, размер линейки 1 мкм.

Последовательность гена 16S рРНК, близкая к полной (1438 п.н.), была амплифицирована и секвенирована. Филогенетический анализ помещает данный изолят в класс Deltaproteobacteria, семейство Desulfovibrionacea, род *Desulfovibrio*. Ближайший родственник штамма ED *D. idahonensis* – 99.6% сходства. *Desulfovibrio* sp. ED относится к группе *D. idahonensis* – *D. mexicanus* (рис. 11).

Результаты ПЦР-ДГГЭ анализа проб из биореактора, отобранных в разных изменение pН временных точках, показали, ЧТО при культивировании накопительных культур влияет на состав доминирующих филотипов. Все определенные филотипы, для которых показана способность к диссимиляционной сульфатредукции, относились к роду Desulfovibrio. Среди не-СРБ филотипов стоит отметить Acinetobacter calcoaceticus. Эта бактерия является частью комплекса A. calcoaceticus-baumannii (Acb), который включает штаммы из кишечника человека. Несколько A. calcoaceticus были выделены из природных экосистем (Chen et al., 2008). Несмотря на то, что в аннотированных геномах Acinetobacter, представленных в базе данных GenBank NCBI, не обнаружены гены сульфитредуктазы (dsrAB), диссимиляционной недавно была показана способность к сульфатрудукции у одного штамма *Acinetobacter* (Han et al., 2015). Однако, исследователи не исключают присутствия в культуре другого организма, ответственного за сульфатредукцию.

В связи с низкой константой диссоциации молочной кислоты при низких значениях pH, было предположено её токсичесое действие на микроорганизмы, и непригодность для использования в качестве субстрата при культивировании ацидофильных СРБ (Alazard et al., 2010; Meier et al., 2012; Sanchez-Andrea et al. 2015). Однако при значениях pH 4.5 – 5.0 около 90% молочной кислоты диссоциирует. Наши результаты подтверждают, что молочную кислоту можно успешно использовать в качестве источника углерода и донора электронов для выделения умеренно ацидофильных СРБ (pH 4.5-5.5). Ацетат является конечным продуктом неполного окисления молочной кислоты культурами *Desulfovibrio* spp., поэтому наблюдаемый нами лизис культуры в биореакторе при pH 3.7, предположительно, мог быть спровоцирован молочной кислотой (pKa 3.86), частичный вклад мог быть внесён уксусной кислотой (pKa 4.75).

Использованный градиент pH, совмещенный с микроскопическим и молекулярным мониторингом, позволил выделить два штамма СРБ, доминирующих в культуре при pH ниже нейтрального.

3.4. Особенности физиологии и анализ генома ацидофильных и ацидотолерантных изолятов СРБ

Были изучены особенности физиологии роста новых штаммов Desulfovibrio Desulfosporosinus sp. NP, значимые для ИХ использования spp. И В биотехнологических схемах. Были определены предельные значения рН для роста и изучена реакция на окислительный стресс. Также проведен анализ генома штамма Desulfovibrio sp. DV с целью обнаружения механизмов защиты. Была проопределена последовательность генома (драфт) Desulfovibrio sp. DV и проведен анализ возможных механизмов защиты от низких рН и высоких концентраций металлов.

3.4.1. Рост при различных рН

Способность штамма *Desulfosporosinus* sp. NP к росту при разных значениях pH проверяли на среде с фруктозой, субстратом, для которого наблюдали оптимальный рост при 28 °C. Штамм способен расти в интервале начальных значений pH среды от 1.3 до 6.7. При начальном значении pH 1.3 отмечали увеличение лаг-фазы до 19 суток, тогда как лаг-фаза при более высоких значениях pH составляла 12 суток. Максимальную численность клеток в среде наблюдали при pH 2.0 – 2.5.

Для штаммов *Desulfovibrio* определены удельные скорости роста на среде с разными значениями pH в присутствии лактата в качестве донора углерода и электронов при 28 °C. Установлено, что *Desulfovibrio* sp. DV способен к росту в диапазоне значений pH среды от 4.0 до 7.0. На рисунке 16 показана зависимость удельной скорости роста штамма DV от начального pH среды. Максимальная удельная скорость роста отмечена при pH 5.5 и составила 0.035 \pm 0.002 ч⁻¹ при времени удвоения 19.8 \pm 1.4 ч.



Рис. 16. Изменение удельной скорости роста *Desulfovibrio* sp. DV в зависимости от pH среды. На диаграмме показаны стандартные отклонения, вычисленные по результатам трех параллельных измерений.

Desulfovibrio sp. ED способен к росту при начальных pH среды от 3.5 до 7.8. По результатам определения удельных скоростей роста штамма *Desulfovibrio* sp. ED при разных значениях pH среды был установлен оптимальный pH для роста штамма, который составил 6.6 (рис. 17). Удельная скорость роста *Desulfovibrio* sp. ED при оптимальном начальном pH среды составила $0.07 \pm 0.006 \text{ ч}^{-1}$, а время удвоения $9.9 \pm 0.8 \text{ ч}$.



Рис. 17. Изменение удельной скорости роста *Desulfovibrio* sp. ED в зависимости от pH среды. На диаграмме показаны стандартные отклонения, вычисленные по результатам трех параллельных измерений.

Desulfovibrio sp. VK характеризовался более широким диапазоном pH для роста. Штамм рос при начальных значениях pH среды от 2.8 до 7.8 (рис. 18). Оптимальное значение начального pH для роста данного штамма составило 5.7. Удельная скорость роста *Desulfovibrio* sp. VK при оптимальном значении pH составляла 0.055 ± 0.003 ч⁻¹ а время удвоения 12.6 ± 0.7 ч. При более высоких значениях pH скорость роста резко снижалась (рис. 18).

Микроскопический анализ показал зависимость морфологии клеток *Desulfovibrio* sp. VK от pH среды. В культуре, выращенной при низких значениях pH (рис. 19 A) наблюдали одиночные или (реже) попарно соединенные клетки. При pH выше нейтрального значения клетки имели более вытянутую форму и
часто образовывали цепочки и конгломераты (рис. 19 Б, В), что, вероятно, было реакцией на неблагоприятные условия роста.



Рис. 18. Изменение удельной скорости роста *Desulfovibrio* sp. VK в зависимости от pH среды. На диаграмме показаны стандартные отклонения, вычисленные по результатам трех параллельных измерений.



Рис. 19. Микрофотографии клеток *Desulfovibrio* sp. VK на среде с начальным pH 4.3 (A) и pH 7.8 (Б, В). Фазово-контрастная микроскопия, размер линейки 5 мкм.

3.4.2. Потребление кислорода и защитные механизмы

Устойчивость к кислороду штаммов продуцентов имеет значение при использовании их в биотехнологиях. Для выделения ацидофильных/ацидотолерантных штаммов *Desulfovibrio* были использованы

осадки, характеризующиеся положительными значениями ОВП. В связи с этим исследовали устойчивость изолятов к кислороду и определяли наличие механизмов защиты от его токсического действия.

Проверяли способность штаммов *Desulfovibrio* sp. DV, *Desulfovibrio* sp. VK и *Desulfovibrio* sp. ED к росту в присутствии кислорода. В качестве положительного контроля использовали *D. vulgaris* Hildenborough, устойчивый к кислороду (Lamrabet et al., 2011; Ramel et al., 2015). Для этого смесь газов (азот и искусственный воздух) непрерывно подавали в пробирки с культуральной жидкостью, обеспечивая содержание O_2 в среде в концентрации 0.01%. В экспериментах использовали оптимальные значения pH среды для каждого штамма при температуре 28 °C.

Исследуемые штаммы не проявляли устойчивости к кислороду в концентрации 0.01% (рис. 20), тогда как для *D. vulgaris* Hildenborough в данных условиях отмечено увеличение численности клеток, которое оценивали по изменению оптической плотности культуральной жидкости (рис. 20).

Для определения присутствия цитохромов клетки штаммов *Desulfovibrio* исследовали методом спектрофотометрии. Спектр с дитионитом натрия характеризовался двумя пиками поглощения в области 553 и 630 нм. Обнаруженные пики, специфичные для гемов цитохромоксидаз с- и d-типов, соответственно, присутствовали на спектрограммах всех трёх исследованных штаммов (рис. 21).

Высокая концентрация гема цитохромоксидазы с-типа в мембранах затрудняет обнаружение гема цитохромоксидазы типа b/o. Максимумы поглощения, характерные для b/o типов гемов в области 560 нм маскируются максимумом поглощения гема цитохромоксидазы типа с в области 553 нм в присутствии такого сильного восстановителя, как дитионит натрия. Спектр поглощения в области 630 нм, спецефичной для гема d, имеет сигмоидальную форму.

74



Рис. 20. Рост штаммов *Desulfovibrio* в присутствии кислорода в концентрации 0.01%. 1 – *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, 2 – *Desulfovibrio* sp. DV, 3 – *Desulfovibrio* sp. VK, 4 – *Desulfovibrio* sp. ED.



Рис. 21. Спектры поглощения клеток *Desulfovibrio* sp. DV (A), *Desulfovibrio* sp. VK (Б), *Desulfovibrio* sp. ED (В) в диапазоне длин волн 500 – 650 нм.

Это связано со способом анализа, когда для образца, восстановленного с помощью дитионита натрия, в качестве контроля используют образец, окисленный феррицианидом калия.

Полученные результаты позволяют сделать предположение о присутствии в клетках исследуемых организмов цитохромоксидаз типа с и типа bd (гидрохинон оксидазы) (рис. 22), которые, как было показано, играют важную роль для защиты анаэробных микроорганизмов от окислительного стресса в аэробных условиях (Lamrabet et al., 2011; Ramel et al., 2015). Содержание цитохрома bd у трех исследуемых нами штаммов *Desulfovibrio* приблизительно одинаковое (0.23 – 0.24 нмоль/мг). Чуть более высокое содержание цитохрома с отмечено для штамма VK (0.33 нмоль/мг) по сравнению с его содержанием в клетках штаммов ED (0.25 нмоль/мг) и DV (0.28 нмоль/мг). Сравнительно низкое содержание цитохрома bd показано для *D. vulgaris* Hildenborough (0.13 нмоль/мг). При этом концентрация цитохрома с в его клетках была гораздо выше, чем у исследуемых штаммов *Desulfovibrio* и составляла 1.34 нмоль/мг (рис. 22). Можно предполагать, что клетки исследуемых штаммов *Desulfovibrio* используют защитый механизм обеспечиваемый цитохромом bd.

Для подтверждения возможности восстанавливать кислород, исследовали способность живых клеток *Desulfovibrio* sp. DV, *Desulfovibrio* sp. VK и *Desulfovibrio* sp. ED к восстанавлению кислорода в присутствии некоторых органических и неорганических доноров электронов. Коэффициенты потребления кислорода клетками в анаэробных условиях оценивали в присутствии лактата, пептона, этанола, глицерола, молекулярного водорода и NADH. Реакция восстановления кислорода водородом в качестве донора электронов, которая известна для *D. vulgaris* Hildenborough (Ramel et al., 2015), не была обнаружена ни для одного из наших объектов исследования, как и способность использовать NADH с этой целью. Однако выявлена способность всех трёх штаммов восстанавливать кислород в присутствии лактата (таблица 4). Для штамма ED также показано восстановление кислорода в присутствии других органических

76

доноров электронов: этанола, пептона и глицерола (таблица 4). Реакция восстановления кислорода ингибировалась при добавлении KCN, во всех случаях.



Рис. 22. Количественное содержание цитохромов с и bd в клетках штаммов *Desulfovibrio*, рассчитанное на основе результатов спектрального анализа клеток в диапазоне длин волн 500 – 650 нм.

Таблица 4. Скорости восстановления кислорода клетками штаммов *Desulfovibrio* DV, VK и ED в присутствии различных доноров электронов

штамм	Субстрат, скорость потребления кислорода имоль мин ⁻¹ мг ⁻¹							
	лактат	Глицерол Пептон		Этанол		NADH		
	(6 мМ)	(11мМ)	(1%)	(25 мМ)	H_2	(2мМ)		
<i>Desulfovibrio</i> sp. DV	33.0	Н.О.	Н.О.	Н.О.	0	0		
Desulfovibrio sp. VK	6.0	Н.О.	Н.О.	Н.О.	0	0		
Desulfovibrio sp. ED	12.8	12.7	2.1	1.4	0	0		

* н.о. – не определяли

Проведенные нами исследования показали, что выделенные штаммы *Desulfovibrio* spp. имеют некоторые молекулярные механизмы защиты от кислорода. Также значительный вклад в устойчивость к кислороду вносит продукция H_2S , который может вступать в реакцию с кислородом. Однако, в сравнении с модельным объектом, *D. vulgaris* Hildenborough, новые изоляты проявили меньшую устойчивость к кислороду. Так как вклад в детоксикацию кислорода вносят сразу несколько систем, можно предположить, что у *D. vulgaris* Hildenborough они развиты в большей степени. Так, в клетках новых изолятов *Desulfovibrio* присутствуют мембранные комплексы цитохромов, но в клетках модельного объекта содержание терминальной цитохромоксидазы с-типа выше. Активность цитохромоксидазы с-типа в клетках *D. vulgaris* Hildenborough составляет 500 нмоль мин⁻¹ мг⁻¹ (Lambert et al., 2011), тогда как в клетках наших штаммах активность этого фермента была близка к нулю (таблица 4).

3.4.3. Анализ генома Desulfovibrio sp. DV

Характеристики генома штамма *Desulfovibrio* sp. DV представлены в таблице 5. В геноме *Desulfovibrio* sp. DV найдено 4 копии рибосомного оперона, включающего гены 5S, 16S и 23S рРНК, 48 генов тРНК и 4350 потенциальных белок-кодирующих генов.

Параметр	<i>Desulfovibrio</i> sp. DV
Размер геном, млн. нт	4.9 млн. нт.
Количество белок-кодирующих генов	4350
GC состав, %	62.95
Гены тРНК	48
Количество рибосомных оперонов	4

Таблица 5. Характеристика генома Desulfovibrio sp. DV

Молекулярные механизмы, которые позволяют микроорганизмам выдерживать высокие концентрации внеклеточных протонов, обобщены в Baker-Austin and Dopson (2007). Одной из наиболее важных систем, участвующих в генерации внутреннего положительного потенциала на мембране клетки, является

Кdp ATPаза. Гомологичная Kdp-ATPаза была найдена в геноме Desulfovibrio sp. DV (номер доступа NCBI с OLN30747.1 по OLN30751.1). Оперон содержал регулятор транскрипции – двухкомпонентную гистидин киназу (номер доступа NCBI OLN30747.1 - OLN30748.1). Калиевая АТРаза присутствовала во всех Desulfovibrio из кластера «magneticus», а именно: D. magneticus, Desulfovibrio sp. TomC, D. alcoholivorans, D. putealis, но отсутствовала во всех других представителях рода Desulfovibrio. Ближайшими родственниками, из которых АТР-аза могла быть получена путем горизонтального переноса, были представители глубоких ветвей филогенетического дерева Nitrospira и Chloroflexi. Несколько дополнительных регулирующих гистидин киназ KdpD присутствовало в геноме (номер доступа NCBI OLN29199.1, OLN28720.1, OLN26279.1, OLN25753.1, OLN24744.1). Интересно присутствие рядом с опероном Кdp гликозил гидролазы (целлюлазы) Cel44A (номер доступа NCBI ген OLN30753.1), являющейся Clostridium ОДНИМ ИЗ основных компонентов целлюлосомы thermocellum.

Кроме транспортирующей К⁺ АТР-азы, в геноме *Desulfovibrio* sp. DV найден целый ряд других переносчиков калия: Trk (номер доступа NCBI OLN31145.1, OLN25063.1), Kef (номер доступа NCBI OLN30294.1, OLN30299.1, OLN25774.1), Kup (номер доступа NCBI OLN26769.1), калиевый канал КОТ (номер доступа NCBI OLN25056.1), TrkH ATP-аза V-типа (номер доступа NCBI OLN25062.1), ионный канал MS (номер доступа NCBI OLN24845.1, OLN24383.1). В поддержании рН цитоплазмы клетки может принимать участие Na+/протон антипортер (номер доступа NCBI OLN30302.1). Транспортеры из этого семейства принимают участие в поддержании рН в клетках с активным метаболизмом. Гомологичные транспортеры обнаружены только в единичных представителях рода *Desulfovibrio*. Ближайшими родственниками Na⁺/протон антипортера из кластера "magneticus" являются таковые из *Verrucomicrobia*. Не исключена возможность, что в *Desulfovibrio* sp. DV найденный белок является К⁺/протон антипортера (OLN30302.1) находится целый ряд других переносчиков калия. Это: система

79

Kef NCBI OLN30294.1, OLN30299.1) (номер транспорта доступа И аннотированный как «extracellular solute-binding protein, family 3», белок (номер доступа NCBI OLN30295.1). Последний содержит домен рецептора глутамата CluR0. Эти домены обнаруживают в CluR0-белках, для которых было показано функционирование в качестве калиевых каналов, активируемых L-глутаматом. Гомолог CluR0-белка присутствует у единичных представителей Desulfovibrio, родственных D. magneticus. Калиевые каналы также известны как ионотропные рецепторы глутамата, iGluRs. В то же время гомологичная система Kef (номер NCBI OLN30294.1, OLN30299.1) присутствует доступа У большинства Desulfovibrio. Ионы калия участвуют в создании положительного заряда на внутренней мембране клетки, препятствуя поступлению избытка протонов в цитоплазму из внешней среды с низким рН. Кроме того, бактерии, обитающие в кислых местообитаниях, могут использовать декарбоксилазы, потребляющие протоны, такие как аргинин декарбоксилаза. Они также найдены в геноме Desulfovibrio sp. DV. Лизин декарбоксилаза (номер доступа NCBI OLN31148.1) присутствовала только у членов кластера «magneticus» и отсутствовала у всех остальных Desulfovibrio. Филогенетический анализ показал, что вероятно белок был получен путем горизонтального переноса из Firmicutes (Bacillus). Очевидно также участие в повышении внутриклеточного рН аргинин декарбоксилазы (номер доступа NCBI OLN29222.1). В защитных механизмах может учавствовать «Pyruvoyl-dependent» аргинин декарбоксилаза (PvlArgDC). Гомологи PvlArgDC найдены в геномах паразитических форм в частности в Chlamydia, где они участвуют в изменении метаболизма клетки-хозяина за счет повышения рН. PvlArgDC из всех Desulfovibrio присутствует только в кластере «magneticus» и вероятно была получена от зеленых серных бактерий.

Штамм *Desulfovibrio* sp. DV не выдерживал концентрации меди в среде выше 375 мг/л. Однако был достаточно устойчив к повышенной концентрации кобальта и мог расти до 1.7 Co(II) г/л. Поиск в геноме показал, что три штамма из кластера «magneticus» имели одинаковые возможные транспортеры кобальта. В *Desulfovibrio* sp. DV это CorA_ZntB семейство транспортеров известных для *E*. 80

Salmonella typhimurium (номер доступа NCBI OLN30126.1). Этот белок coli и присутствовал кроме штамма DV только в Desulfovibrio magneticus и Desulfovibrio sp. TomC. Все остальные ближайшие родственники относились к Firmicutes и сходство последовательностей аминокислот составляло около 30 %. Интересно что среди фирмикут ближайшими родственниками отметить, являются сульфатредуцирующие термофилы Thermodesulfotator atlanticus и Desulfovirgula thermocuniculi. Также в геноме Desulfovibrio sp. DV присутствовали RNDтранспортер Сzc (номер доступа NCBI гены OLN30143.1, OLN30144.1, OLN30145.1, OLN30146.1). Обнаруженные в геноме Desulfovibrio sp. DV транспортеры металлов представлены в таблице 6.

Таблица 6. Транспортеры и другие гены, участвующие в механизмах устойчивости к металлам в геноме штамма Desulfovibrio sp. DV

Номер гена в контигах	Размер белка, аминокислот ных остатков	Белок	Ближайший родственник	% сходства с ближайшим родственником	Размер белка, аминокисл отных остатков	Номер доступа в NCBI GenBank	Возможная функция
1	2	3	4	5	6	7	8
gene0218	259	Additional periplasmic component NikK of nickel ECF transporter	<i>Desulfovibrio</i> sp. TomC	88 %	259	WP_043630407.1	Транспорт никеля
gene0219	202	Substrate- specific component NikM of nickel ECF transporter	<i>Desulfovibrio</i> sp. TomC	97 %	202	WP_043630410.1	Транспорт никеля
gene0220	220	ATPase component NikO of energizing module of nickel ECF transporter	<i>Desulfovibrio</i> sp. TomC	94 %	241	WP_015261865	Транспорт никеля

Продолжение Таблицы 6

1	2	3	4	5	6	7	8
gene0221	255	Transmembrane component NikQ of energizing module of nickel ECF transporter	<i>Desulfovibrio</i> sp. TomC	88 %	255	WP_043630414.1	Транспорт никеля
gene0222	220	ATPase component NikO of energizing module of nickel ECF transporter	<i>Desulfovibrio</i> sp. TomC	94 %	220	WP_043630417.1	АВС-транспортер. Транспорт кобальта для синтеза кобаламина
gene0370	223	DNA-binding heavy metal response regulator	<i>Desulfovibrio</i> sp. TomC	98 %	223	WP_043640189.1	Устойчивость к кобальту, цинку, кадмию
gene0569	375	Probable Co/Zn/Cd efflux system membrane fusion protein	<i>Desulfovibrio</i> sp. TomC	85 %	375	WP_043636938.1	RND-transporter Горизонтальный перенос из альфапротеобактерия. Присутствует только у Desulfovibrio sp. TomC и Desulfovibrio magneticus

Окончание Таблицы 6

1	2	3	4	5	6	7	8
gene0676	146	Copper chaperone	Desulfovibrio magneticus	84 %	146	WP_015861490.1	Есть только у Desulfovibrio sp. TomC и Desulfovibrio magneticus и еще двух штаммов Desulfovibrio. Достаточно большой по сравнению с другими медными шаперонами
gene0677	743	Lead, cadmium, zinc and mercury transporting ATPase (EC 3.6.3.3) (EC 3.6.3.5); Copper- translocating P-type ATPase (EC 3.6.3.4)	<i>Desulfovibrio</i> sp. TomC	90 %	743	WP_043638110	Есть только у <i>Desulfovibrio</i> sp. TomC и <i>Desulfovibrio magneticus</i> и еще двух штаммов <i>Desulfovibrio</i> . Возможно горизонтальный перенос
gene0728	317	Magnesium and cobalt transport protein CorA	<i>Desulfovibrio</i> sp. TomC	91 %	189	WP_043632712	Есть у некоторых Desulfovibrio
gene0745	437	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcA; Cation efflux system protein CusA	<i>Desulf</i> ovibrio sp. TomC	99 %	537	WP_043640512	RND-транспортер, выкачивающий белок из внешней мембраны.

3.5. Устойчивость к металлам и образование сульфидов кобальта (II) штаммами СРБ при периодическом культивировании

Были проведены эксперименты по определению устойчивости к ионам двухвалентных металлов (Ni(II), Cu(II), Cd(II) и Co(II)) штаммов *Desulfovibrio* spp. и *Desulfosporosinus* sp. NP и исследовано образование кристаллических фаз при периодическом культивировании изолятов в присутствии ионов Co(II).

3.5.1. Устойчивость к металлам

Устойчивость штаммов-продуцентов к металлам является одним из лимитирующих условий для их использования в биотехнологических схемах очистки отходов от растворенных металлов или получения кристаллических сульфидов. В связи с этим была проведена серия экспериментов для определения предельных концентраций Ni(II), Co(II), Cu(II) и Cd(II), при которых возможен рост исследуемых штаммов *Desulfosporosinus* и *Desulfovibrio*.

Определены максимальные концентрации двухвалентных металлов, позволяющих рост *Desulfosporosinus* sp. NP. Штамм способен выдерживать сравнительно невысокие концентрации Ni(II), Co(II) и Cu(II) (таблица 7). Штаммы *Desulfosporosinus*, выделенные ранее из мест добычи сульфидных руд, обладали большей устойчивостью к металлам, по сравнению со штаммом NP (Abicht et al. 2011; Mardanov et al. 2016; Karnachuk et al. 2015). Максимальная концентрация Cd(II) в среде, при которой наблюдали рост, составила 100 мг/л, что ниже, чем максимальные концентрации других металлов. Присутствие кадмия в среде значительно увеличивало продолжительность лаг-фазы у штамма NP от 12 (на среде без Cd(II)) до 45 суток (в присутствии 100 мг/л Cd(II)).

Определили предельные концентрации ионов меди, никеля, кобальта и кадмия, при которых был возможен рост штамма *Desulfovibrio* sp. DV (таблица 7). Штамм DV оказался устойчивым к ионам Co(II) в концентрации до 1650 мг/л. В присутствии высоких концентраций ионов кобальта отмечали увеличение

продолжительности лаг-фазы от 3 до 7 суток. Внесение в среду Cd(II) также увеличивало лаг-фазу, при этом максимальная концентрация кадмия, позволяющая рост штамма DV, составила лишь 50 мг/л.

Таблица 7. Предельные концентрации металлов позволяющие рост штаммов СРБ, определенные при оптимальных значениях рН

IIImova	Предельные концентрации металлов, мг/л					
ШТамм	Cu	Cd	Ni	Co		
Desulfovibrio sp. DV	325	50	175	1650		
Desulfovibrio sp. VK	275	60	250	3500		
Desulfovibrio sp. ED	100	70	150	2000		
Desulfosporosinus sp. NP	200	100	200	225		

Максимальные концентрации Ni(II), Cd(II) и Cu(II), при которых возможен рост *Desulfovibrio* sp. VK отмечены примерно на том же уровне, что максимальные концентрации этих металлов для штамма DV (Таблица 7). Однако штамм проявлял наибольшую устойчивость к ионам кобальта в концентрации до 3500 мг/л. Продолжительность лаг-фазы при росте штамма VK на среде с кобальтом в концентрациях менее 1000 мг/л не превышала 3 суток. При дальнейшем увеличении концентрации Co(II) продолжительность лаг-фазы увеличивалась до 7 суток.

Desulfovibrio sp. ED также проявлял устойчивость к высоким концентрациям Co(II) в среде (до 2000 мг/л) (таблица 7). Предельные концентрации Cu(II) и Ni(II), позволяющие рост клеток штамма, были невысокими. Штамм проявлял устойчивость к Cd(II) в концентрации до 70 мг/л, что приблизительно соответствует предельным концентрациям кадмия для роста штаммов DV и VK.

Исследуемые штаммы проявили наименьшую устойчивость к ионам кадмия, это объясняется высокой токсичностью этого металла. Благодаря сходству с катионами меди и кобальта, в транспорте кадмия могут быть задействованы некоторые ATP-азы, а сам металл может замещать кофакторы в ферментах, блокируя их работу, также этот металл приводит к дестабилизации клеточных мембран (Iftikhar et al., 2014). Высокая устойчивость исследованных штаммов *Desulfovibrio* к Co(II) может объясняться наличием систем подержания гомеостаза. Так в геноме *Desulfovibrio* sp. DV были обнаружены спецефические транспортеры, осуществляющие транспорт кобальта как наружу, так и внутрь клетки для синтеза кобаламина.

3.5.2. Образование сульфидов металлов

СРБ потенциально могут быть использованы как штаммы-продуценты в биотехнологиях получения кристаллических сульфидов металлов, в том числе наноразмерных.

Так как исследуемые штаммы, а особенно штаммы *Desulfovibrio*, были устойчивы к ионам кобальта, образование ими сульфидов кобальта было изучено при периодическом культивировании. С учетом устойчивости к Co(II) для эксперимента выбрали следующие концентрации металла: 175 мг/л для *Desulfosporosinus* sp. NP, 600 мг/л для *Desulfovibrio* sp. VK, 1000 мг/л для *Desulfovibrio* sp. ED и *Desulfovibrio* sp. DV.

Кристаллические сульфиды кобальта были обнаружены в осадках, полученных при культивировании всех исследуемых штаммов *Desulfovibrio* sp. В присутствии Co(II). Рентгенофазовый анализ осадков, полученных в контрольных условиях без клеток микроорганизмов, не выявил кристаллических структур, характерных для сульфидов кобальта. Во всех исследованных контрольных образцах были идентифицированы только хлорид натрия, галлит (NaCl) и фосфат железа, вивианит (Fe₃(PO₄)₂·8H₂O) (рис. 23).

Desulfosporosinus sp. NP образовывал кристаллические сульфиды кобальта при периодическом культивировании на среде с фруктозой в присутствии 175 мг/л Co(II) в течение 28 суток. На дифрактограмме осадка (рис. 24 Б) показаны пики характерные для двух типов кристаллических фаз сульфида кобальта: джайпурита (CoS) и кобальтпетландита (Co₉S₈). На микрофотографии осадка (рис. 24 А) видна кристаллическая структура виде пересекающихся пластинок,

87

характерная для сульфидов кобальта. Анализ осадков, полученных при культивировании *Desulfosporosinus* sp. NP в присутствии Co(II), выполненный методом SEM-EDS показал присутствие в них кобальта, серы и, в меньшей степени, железа в качестве преобладающих элементов (рис. 24 A).

Дополнительной кристаллической фазой в осадке, отличной от сульфидов кобальта, был хлорид натрия (галлит) (рис. 24 Б). Этот минерал образуется в результате кристаллизации компонентов питательной среды, не является биогенным и на ряду с вивианитом, присутствовал в контрольных образцах осадка, полученных при инкубировании питательной среды без клеток микроорганизмов (рис. 23).



Рис. 23. Образование минералов в контроле без СРБ в присутсвии кобальта в концентрации 300 мг/л в течении 28 сут. (А) Микрофотографии и элементный анализ осадка, определенный методом SEM-EDS. (Б) Дифрактограмма осадка и обнаруженные кристаллические фазы. Размер линейки указан в мкм.



Рис. 24. Образование сульфидов кобальта *Desulfosporosinus* sp. NP при культивировании при периодическом культивировании на среде с фруктозой в присутствии 175 мг/л Co(II) в течение 28 суток. (А) Микрофотографии осадка и соответствующий ЭДС спектр; (Б) Дифрактограмма осадка и обнаруженные кристаллические фазы. Размер линейки указан в мкм.

В осадках, образованных Desulfovibrio sp. DV на среде с лактатом в присутствии 1000 мг/л Co(II), также преобладали кобальт, сера и железо (рис. 25 A). Ha микрофотографии видны сферические структуры, образованные пластинками кристаллов (рис. 25 A). Данные дифракционного анализа (XRD) образовании штаммом сульфидов свидетельствуют об кобальта В виде кобальтпетландита (Со₉S₈) без джайпурита (CoS) примесей И других кристаллических фаз (рис. 25 Б). Просвечивающая электронная микроскопия ультратонких срезов клеток, совмещенная с энергодисперсионным анализом (TEM-EDS), показала, что кобальт и сера иммобилизованы на поверхности клеток (рис. 25 В).



Рис. 25. Образование сульфидов кобальта *Desulfovibrio* sp. DV при периодическом культивировании на среде с лактатом в присутствии 1000 мг/л Co(II) в течение 28 суток. (А) Микрофотографии осадка и соответствующий ЭДС-спектр; (Б) Дифрактограмма осадка и обнаруженные кристаллические фазы; (В) Микрофотографии ультратонких срезов клеток и соответствующие элементные карты S и Co. Размер линейки указан в мкм.

Кристаллические фазы, обнаруженные в осадке после культивирования *Desulfosporosinus* sp. VK в присутствии 600 мг/л Co(II), включали сульфиды кобальта джайпурит (CoS) и кобальтпентландит (Co₉S₈) (рис. 26 Б). Осадок также содержал примесь хлорида натрия, галлита (NaCl). Сферические формы кристаллов, характерные для сульфида кобальта, в осадке, образованном штаммом VK, соседствовали с кристаллами другого типа (рис. 26 А). При этом кобальт, сера и, в меньшей степени, железо оставались преобладающими элементами в осадке (рис. 26 А).



Рис. 26. Образование сульфидов кобальта *Desulfovibrio* sp. VK при периодическом культивировании на среде с лактатом в присутствии 600 мг/л Co(II) в течение 28 суток. (А) Микрофотографии осадка и соответствующий ЭДС-спектр; (Б) Дифрактограмма осадка и обнаруженные кристаллические фазы. Размер линейки указан в мкм.

Рентгенофазовый анализ осадка, образованного *Desulfovibrio* sp. ED на среде с лактатом в присутствии Co(II) в концентрации 1000 мг/л в течение 28 суток, подтвердил присутствие кристаллических фаз джайпурита (CoS) и кобальтпетландита (Co₉S₈) (рис. 27 Б). Кристаллы имели характерную сферическую структуру, образованную пересекающимися пластинками (рис. 27 А). Кобальт, сера и железо преобладали в осадке (рис. 27 А, ЭДС спектр).

Во всех исследованных культурах наблюдали образование кристаллических структур, характерных для сульфида кобальта: джайпурита и кобальтпентландита. При этом была показана иммобилизация кобальта и серы на поверхности бактериальных клеток (рис. 25). В данном случае клетки выступают в качестве

центра нуклеации кристаллов благодаря образованию сульфидов кобальта при реакции катионов, связанных с поверхностными структурами клетки и биогенным сероводородом. Было показано как в данном исследовании, так и в работах других исследователей (Jencarova et al., 2014), что в контрольных опытах (без СРБ) образуются только кристаллы вивионита (фосфата железа) (рис.23).



Рис. 27. Образование сульфидов *Desulfovibrio* sp. ED при периодическом культивировании на среде с лактатом в присутствии 1000 мг/л Co(II) в течение 28 суток. (А) Микрофотографии и соответствующий ЭДС-спектр; (Б) Дифрактограмма осадка и обнаруженные кристаллические фазы. Размер линейки указан в мкм.

3.6. Культивирование ацидофильных СРБ и образование сульфидов металлов при непрерывном культивировании

Культивирование ацидофильных *Desulfosporosinus* в биореакторе. Ацидофильные *Desulfosporosinus* потенциально могут быть использованы в промышленности для осаждения металлов в виде сульфидов из кислых шахтных

отходов. В экспериментах по непрерывному культивированию ацидофильных СРБ использовали *Desulfosporosinus* sp. I2 (Mardanov 2016) и et al., Desulfosporosinus sp. BG (Karnachuk et al., 2015), из коллекции микроорганизмов, поддерживаемой на Кафедре физиологии растений и биотехнологии. Штаммы были выделены ранее из отходов добычи сульфидов металлов и имеют оптимум рН для роста Desulfosporosinus sp. I2 – 2.0 и Desulfosporosinus sp. BG – 2.6. Также были проведены эксперименты с Desulfosporosinus sp. NP, выделенным из шахтных отходов месторождения Шерловая Гора. Попытки культивирования Desulfosporosinus биореакторе объемом ацидофильных В 2 литра при периодическом культивировании не дали положительных результатов. После внесения инокулята происходил лизис культуры, о чем свидетельствовало наблюдение клеток под микроскопом и снижение концентрации белка и сероводорода в культуральной среде (рис. 28).

Попытки культивирования *Desulfosporosinus* sp. I2 и *Desulfosporosinus* sp. BG осуществляли в режиме pH-стата, поддерживая постоянный pH 3.5 и 3, соответственно. В культуре *Desulfosporosinus* sp. I2 лизис происходил после 70 часов культивирования, в то время как *Desulfosporosinus* sp. BG оставались интактными в биореакторе в течение более 300 часов, однако деления клеток и увеличения биомассы не происходило. При культивировании *Desulfosporosinus* sp. NP не использовали режим pH-стата в первые 210 часов культивирования. При этом pH увеличивался с 2.2 до 5.0 после чего биореактор был переведен в режим pH-стата. Однако увеличения биомассы не удалось достигнуть и в условиях более высоких pH, и реактор был остановлен после 350 часов культивирования.

3.6.1. Культивирование ацидофильных СРБ при непрерывном режиме

Было сделано предположение, что бинарная культура ацидофильных СРБ может быть выращена в биореакторе. Для создания бинарной культуры были объединены *Desulfosporosinus* sp. NP и *Desulfvibrio* sp. VK в равных объемах.

Для культивирования в биореакторе использовали среду Видделя-Бака, в качестве доноров электрона вносили лактат (1.6 мМ) и фруктозу (55 мМ). Фруктоза является предпочтительным субстратом для *Desulfosporosinus* sp. NP, а лактат – для *Desulfvibrio* sp. VK. Начальный pH среды установили на уровне 4.5 в соответствии с физиологическими характеристиками *Desulfvibrio* sp. VK. Культивирование проводили при темпертуре 28°C. Существенные различия в морфологии культур позволили оценивать количество клеток двух штаммов без применения молекулярных зондов.



Рис. 28. Изменение концентрации белка и сероводорода и изменение pH при культивировании штаммов *Desulfosporosinus* sp. I2 (A), *Desulfosporosinus* sp. BG (Б) и *Desulfosporosinus* sp. NP (B) в биореакторе.



Рис. 29. Изменение концентрации белка и сероводорода и изменение pH при культивировании бинарной культуры *Desulfosporosinus* sp. NP и *Desulfovibrio* sp. VK в биореакторе на среде с фруктозой и лактатом (A), и изменение количества клеток каждого штамма (Б) (n=3).

Первоначальный лизис клеток сопровождался увеличением pH в биореакторе до 7.2 после 86 часов культивирования (Рис. 29). После достижения этого значения было принято решение о снижении уровня pH в соответствии с физиологическими характеристиками штаммов. С помощью автоматического титрования pH снизили до значения 7.0 и поддерживали на этом уровне до точки 216 часов. Далее продолжили снижение pH со скоростью 0.1 единицы в сутки.

Все это время в бинарной культуре преобладали вибрионы и их численность оставалась незначительной. В точке 426 часов при pH 6.3 наблюдали повышение концентрации сероводорода до 69 и белка до 93 мг/л. Микроскопический анализ показал, что культура в этой точке была представлена приблизительно одинаковым количеством клеток обоих штаммов, как *Desulfosporosinus* sp. NP, так и *Desulfovibrio* sp. DV (рис. 30). Численность клеток каждого штамма составляла около 10^6 клеток в 1 мл культуральной жидкости (рис. 29 Б). Дальнейшее снижение pH ингибировало рост клеток штамма VK (вибрионов) и стимулировало рост палочковидных клеток штамма NP.



Рис. 30. Микрофотография бинарной культуры *Desulfosporosinus* sp. NP и *Desulfovibrio* sp VK, растущей в биореакторе, в точке 730 часов. Фазовоконтрастная микроскопия, линейка 5 мкм.

Через 756 часов после начала культивирования в биореактор была добавлена свежая питательная среда с фруктозой в качестве единственного донора электронов и источника углерода. Если до этого момента в качестве субстрата для роста бинарной культуры использовали смесь фруктозы и лактата, то с целью создания благоприятных условий для роста штамма NP лактат был удален из смеси. Разбавление культуральной жидкости и, возможно, смена ростового субстрата привели к временному снижению биомассы и, соответственно, уменьшению продукции сероводорода. На фоне резкого понижения численности клеток (рис. 29 Б) концентрация белка снизилась до 27 мг/л, а концентрация сероводорода - до 1.5 мг/л (рис. 29 А).

Численность клеток заметно увеличилась через 905 часов, при этом в биореакторе преобладали *Desulfosporosinus* sp. NP (рис. 29 Б). Далее продолжили снижение pH до значения 5.4 и биореактор был переведен в режим pH-стата после 929 часов от начала культивирования. Через 1187 часов повторно добавили 1 л среды с фруктозой, после чего наблюдали увеличение численности клеток *Desulfosporosinus* sp. NP, биомассы и прирост сероводорода (рис. 29 А, Б). В точке 1360 часов концентрация белка и сероводорода достигла максимальных значений - 337 и 371 мг/л, соответственно (рис. 29 А). В биореакторе доминировали клетки штамма NP. В точке 1523 часа биореактор перевели в проточный режим культивирования с постоянной скоростью подачи питательной среды 13 мл/ч.

Способность штаммов-продуцентов расти при проточном режиме культивирования является важной биотехнологической характеристикой, однако не все СРБ растут при использовании подобного способа культивирования. Наши первые попытки культивировать штаммы *Desulfosporosinus* spp. в биореакторе завершились неудачей. Совместное культивирование *Desulfosporosinus* sp. NP с *Desulfovibrio* sp VK, оказало стимулирующее действие на рост целевого штамма. Различия в физиологических предпочтениях у выбранных обектах позволило нам в значительной степени подавить рост штамма VK.

3.6.2. Получение сульфидов металлов в биореакторе с проточным режимом культивирования

Для изучения осаждения металлов под действием бинарной культуры СРБ, начиная с точки 1761 час (после стабилизации биомассы) в биореактор начали подавать питательную среду с ионами меди (II) в концентрации 50 мг/л (рис. 31 А). Концентрацию ионов меди постепенно повышали до 100, 150 и 200 мг/л.

После 3156 часов культивирования по той же схеме в среду добавляли ионы кобальта (II) (рис. 31 Б). Биореактор был остановлен после 4500 часов культивирования, после того, как концентрацию ионов кобальта в протоке увеличили до 200 мг/л, что вызвало лизис клеток (рис. 31 Б).



Рис. 31. Изменение концентрации белка и сероводорода при культивировании бинарной культуры *Desulfosporosinus* sp. NP и *Desulfovibrio* sp VK в биореакторе в проточном режиме на среде с фруктозой и с добавлением ионов меди (II) (A) и ионов кобальта (II) (Б). Показаны исходные концентрации металлов в питательной среде и кристаллические фазы, обнаруженные в осадках (n=3).

Концентрация металлов в пробах культуральной жидкости из биореактора была проанализирована методом ICP-MS в динамике. Максимальная концентрация меди в культуральной жидкости не превышала 4.6 мг/л, тогда как исходная концентрация ионов меди (II) в питательной среде, подаваемой в биореактор, составляла 200 мг/л (рис. 32). При внесении Си в концентрации 50 мг/л концентрация не осажденной меди в культуральной среде не превышала 0.4 мг/л.



Рис. 32. Содержание меди в биореакторе при проточном культивировании бинарной культуры *Desulfosporosinus* sp. NP и *Desulfovibrio* sp. VK. Оттенками синего цвета обозначены исходные концентрации ионов меди (II) в питательной среде, подаваемой в биореактор.

Снижение концентрации меди и сероводорода в биореакторе связано с образованием сульфидов с низкой растворимостью. Осадки, образованные в ходе культивирования бинарной культуры в протоке в присутствии ионов меди (II), были собраны в нескольких временных точках (рис. 31 А) и исследован их элементный и минералогический состав. Сканирующая электронная микроскопия,

совмещенная с энерго-дисперсионным анализом (SEM-EDS), показала присутствие меди, серы и железа во всех исследованных осадках (рис. 33).



Рис. 33. Микрофотографии и ЭДС-спектры (SEM-EDS) осадков, полученных при культивировании бинарной культуры *Desulfosporosinus* sp. NP и *Desulfovibrio* sp. VK в биореакторе в присутствии ионов меди в разные временные точки: 2026 ч – А, 2299 ч – Б, 2485 ч – В, 2702 ч – Г. Размер линейки указан в мкм.

Для определения кристаллических фаз был выполнен рентгенофазовый анализ (XRD) осадков. Дифрактограммы осадков, собранных в разное время и при

различных исходных концентрациях меди (II) в питательной среде, представлены на рис. 34.



Рис. 34. Дифрактограммы осадков, образованных при культивировании бинарной культуры *Desulfosporosinus* sp. NP и *Desulfovibrio* sp. VK в биореакторе в присутствии ионов меди.

В точке 1910 часов, через 149 часов после внесения меди в концентрации 50 мг/л единственной обнаруженной кристаллической фазой был сульфид железа, пирит (FeS₂) (рис. 34 A). Однако, элементный анализ показал также наличие Си в осадке. Вероятно, для образования кристаллического сульфида меди необходимо 101

время. Образование кристаллических сульфидов меди – халькопирита (CuFeS₂), кубанита (CuFe₂S₃), орикита ((CuFeS₂)хH₂O) наблюдали лишь по прошествии 265 часов после начала подачи питательной среды, содержащей медь в концентрации 50 мг/л. Дополнительным источником Fe в среде была железная проволока, ацидофилов. используемая при культивировании Повышение исходной концентрации меди в питательной среде до 100 мг/л приводило к образованию сульфидов меди дефицитных по железу – ярровита (Cu₂S₈) и халькоцита (Cu₂S) (рис. 34 В, Г). При дальнейшем повышении концентрации меди (II) до 150 мг/л выявлена единственная фаза ярровита (Cu_9S_8) (рис. 34 Д, Е). Тогда как при подаче с исходной концентрацией меди 200 мг/л происходила среды смена кристаллических фаз, и формировались другие сульфиды – халькопирит (CuFeS₂) и моносульфид меди, ковеллит (CuS) (рис. 34 Ж). Вероятно, фактором, определяющим кристаллическую форму образуемых сульфидов, была концентрация меди в питательной среде. Интересно отметить, что халькопирит и ковеллит были также основными кристаллическими фазами, образуемыми Desulfosporosinus sp. BG (Карначук и др., 2015) и Desulfosporosinus sp. DB (Ikkert et al., 2013) при периодическом культивировании штаммов в присутствии меди с исходной концентрацией 200 мг/л.

Через 3150 часов от начала культивирования в биореакторе подача меди была заменена на внесение кобальта (II). Элементный анализ культуральной жидкости в динамике (между 3180 и 3612 часами культивирования) показал, что максимальная концентрация кобальта в биореакторе не превышала 5.4 мг/л, тогда как максимальная исходная концентрация ионов кобальта (II), поступающая в биореактор в этот период составляла 100 мг/л (рис. 35). Более 90% ионов кобальта (II), поступивших в биореактор, связывалась сероводородом.



Рис. 35. Содержание кобальта в биореакторе при проточном культивировании бинарной культуры *Desulfosporosinus* sp. NP и *Desulfovibrio* sp. VK. Оттенками красного цвета обозначены исходные концентрации ионов кобальта (II) в питательной среде, подаваемой в биореактор.

При культивировании бинарной культуры СРБ в биореакторе в присутствии ионов кобальта (II), были собраны осадки в трех временных точках (рис. 31 Б). Рентгенофазовый анализ осадков показал отсутствие кристаллических сульфидов кобальта после 120 часов культивирования в присутствии ионов кобальта (II). Единственными фазами были сульфиды меди, ковеллит (CuS) и халькопирит (CuFeS₂) и сульфид железа марказит (FeS₂) (рис. 36 А). Вероятно, в этот промежуток осаждался только аморфный сульфид кобальта.



Рис. 36. Дифрактограмма осадков, образованных в биореакторе при культивировании *Desulfosporosinus* sp. NP и *Desulfovibrio* sp. VK в присутствии ионов кобальта. А, Б, В – рентгенограммы осадков, полученных в разное время.

Кристаллическую фазу, соответствующую сульфиду кобальта – линнаит (Co₃S₄), обнаружили только через 292 часа (3448 часов после начала культивирования) после начала подачи питательной среды, содержащей кобальт. В это же время в составе осадка присутствовали кристаллические сульфиды железа и меди - пирротин (Fe₇S₈), халькопирит (CuFeS₂) и халькоцит (Cu₂S) (рис. 36 Б). В осадке, который получили в точке 4368 ч, кристаллические фазы отсутствовали (рис. 36 В). Вероятно, скорость протока в биореакторе была слишком велика для успешной нуклеации кристаллических сульфидов кобальта. Элементный анализ осадков из точек 3448 ч (рис. 37 А) и 4368 ч (рис. 37 Б) после начала культивирования показал в них присутсвие кобальта.



Рис. 37. Микрофотографии и элементный анализ методом SEM-EDS осадков, полученных при культивировании бинарной культуры *Desulfosporosinus* sp. NP и *Desulfovibrio* sp. VK в биореакторе в присутствии ионов кобальта в разные временные точки (А и Б). Размер линейки указан в мкм.

Микроскопический анализ позволил установить, что при культивировании *Desulfovibrio* sp. VK в бинарной культуре с *Desulfosporosinus* sp. NP внесение ионов Cu(II) влияет на морфологию клеток штамма VK. Так при добавлении меди в концентрации 150 мг/л наблюдали образование сферопластов клетками штамма VK, тогда как клетки штамма NP сохраняли нормальную морфологию (рис. 38).



Рис. 38. Микрофотографии клеток *Desulfosporosinus* sp. NP и *Desulfovibrio* sp. VK в бинарной культуре в биореакторе, точка 3133 часа. Фазово-контрастная микроскопия, размер линейки 5 мкм.

Интересно, что после завершения эксперимента внутренних на поверхностях культурального сосуда биореактора были обнаружены сульфидные 39 A). Рентгенофазовый отложения (рис. анализ выявил присутствие халькопирита (CuFeS₂), джайпурита (CoS) и гидрата сульфита кобальта (CoSO₃×2,5H₂O) (рис. 39 В).



Рис. 39. Образование кристаллических сульфидов металлов на внутренних поверхностях ёмкости биореактора при культивировании бинарной культуры *Desulfosporosinus* sp. NP и *Desulfovibrio* sp. VK: сульфидные отложения на роторе мешалки (А), микрофотографии и ЭДС-спектр отложений (Б), дифрактограмма отложений (В). Линейки показаны в мкм.

Данный экперимент показал, что можно добиться высокой эффективности осаждения металлов из культуральной жидкости с помошью СРБ при проточном культивировании. Результаты ICP-MS анализа свидететельствуют о том, что 95% поступаемого металла связывалось биогенным сероводородом. В биореакторе под действием СРБ образовывались кристаллические сульфиды меди и кобальта. 107

Отсутствие кристаллических фаз сульфида кобальта в культуральной жидкости можно объяснить более длительным временем кристаллизации, так как анализ SEM-EDS показал присутствие кобальта и серы в образцах осадков. Характерные кристаллические фазы сульфида кобальта были обнаружены в отложениях на поверхностях культурального сосуда в совокупности с сульфидами меди и железа. Толщина отложений на внутренних поверхностях культурального сосуда составляла 2-3 мм. Возможно, сульфидные отложения могли быть образованы бактериальными пленками, так как при микроскопировании препаратов с культурами *Desulfosporosinus* мы часто отмечали скопления клеток.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Новый подход к культивированию и использование временного градиента pH в биореакторе позволили получить ацидофильные/ацидотолерантные СРБ, относящиеся к роду *Desulfovibrio*. Ранее все попытки выделения чистых культур этого рода оставались безуспешными, хотя присутствие молекулярных подписей было обнаружено в различных кислых шахтных дренажах. Однако, представители рода *Desulfosporosinus* способны расти при более низких значениях pH. В частности, выделенный нами из отходов добычи полиметаллических руд в Забайкалье *Desulfosporosinus* sp. NP, мог расти в пределах pH от 1.3 до 6.7. В то время как ни один из выделенных *Desulfovibrio* не выдерживал pH ниже 2.8.

В связи с возможным использованием новых ацидо- и метал- толерантных СРБ в качестве штаммов-продуцентов в биотехнологических схемах, исследовали устойчивость изолятов *Desulfovibrio* к кислороду и определяли наличие механизмов защиты. Устойчивость к кислороду у исследованных штаммов была ниже по сравнению с модельным СРБ *Desulfovibrio vulgaris* Hildeborough, однако в клетках новых штаммов *Desulfovibrio* обнаружено присутствие цитохрома bd, одного из возможных механизмов защиты от токсического действия кислорода. Все новые штаммы *Desulfovibrio* способны восстанавливать кислород, используя лактат в качестве донора электронов, что может обеспечивать защиту от O_2 . Для штамма ED также показано восстановление кислорода в присутствии других органических доноров электронов: этанола, пептона и глицерола.

С точки зрения возможного использования ацидофильных СРБ в технологиях осаждения/получения сульфидов металлов и культивирования *Desulfosporosinus* в условиях непрерывной культуры может быть перспективным paspaботанный нами подход создания бинарных культур с *Desulfovibrio*. Изменение условий культивирования в биореакторе позволяло получать различные кристаллические сульфиды меди и кобальта. Образование твердых фаз сульфидов меди в отличие от сульфидов кобальта происходило эффективно в условиях непрерывного культивирования. При этом эффективность удаления ионов меди из раствора 109

достигала 95%. Для биоминерализации Со, в том числе для получения микрокристаллов, перспективных для использования в качестве современных катализаторов, предпочтительными были условия периодической культуры.

выводы

- 1. Выделены в чистую культуру и охарактеризованы новые ацидофильные сульфатредуцирующие бактерии *Desulfosporosinus* sp. NP, способный к росту от pH 1.3 до 6.7, и *Desulfovibrio* sp. DV (оптимальный pH 5.5), перспективные для получения сульфидов металлов.
- 2. Путем создания градиента pH в биореакторе обогащены и выделены в чистые культуры ацидофильный *Desulfovibrio* sp. VK и ацидотолерантный *Desulfovibrio* sp. ED, устойчивые к ионам кобальта в концентрации 3.5 г/л и 2.0 г/л, соответственно.
- 3. Определена последовательность генома (драфт) ацидофильного устойчивого к металлам *Desulfovibrio* sp. DV. Обнаружены транспортеры калия (Kdp ATPaзa) и натрия (Na⁺/протон антипортер), которые могут обеспечивать устойчивость к низким pH, а также потребляющие протоны декарбоксилазы аминокислот. Устойчивость к Co(II) могут обеспечивать транспортеры CorA-ZntB и RNDтранспортер Czc.
- При непрерывном культивировании в биореакторе *Desulfosporosinus* sp. NP и *Desulfovibrio* sp. VK получены кристаллические сульфиды меди: ярровит (Cu₉S₈), халькоцит (Cu₂S) и ковеллит (CuS), достигнуто осаждение меди из среды до 95%.
- 5. Показана способность к образованию макро- и микрокристаллов сульфида кобальта, джайпурита (CoS) и кобальтпентландита (Co₉S₈), чистыми культурами *Desulfosporosinus* sp. NP, *Desulfovibrio* sp. ED, *Desulfovibrio* sp. DV и *Desulfovibrio* sp. VK при периодическом культивировании.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Abdollahi H., Wimpenny J. Effects of oxygen on the growth of Desulfovibrio desulfuricans // J. Gen. Microbiol. - 1990. – V. 136. – P. 1025-1030.
- Abicht H. K., Mancini S., Karnachuk O. V., Solioz M. Genome Sequence of *Desulfosporosinus* sp. OT, an acidophilic sulfate-reducing bacterium from copper mining waste in Norilsk, Northern Siberia // Journal of Bacteriology. - 2011 - V. 193 (21). - P. 6104-6105.
- Akagi J. M. Respiratory sulfate reduction. In L. L. Barton (Ed.), Sulphate reducing bacteria // New York: Plenum Press. - 1995. - P. 89-111.
- Akagi J. M., Chan M., & Adams V. Observations on the bisulfite reductase (P582) isolated from Desulfotomaculum nigrificans // Journal of Bacteriology. - 1974. - V. 120. - P. 240-244.
- Alazard D., Joseph M., Battaglia-Brunet F., Cayol J. L., Ollivier B. Desulfosporosinus acidiphilus sp. nov.: a moderately acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acid mining drainage sediments // Extremophiles. – 2010.
 V. 14. - P. 305-312.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. G. BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Res. – 1997. - V. 25. - P. 3389-3402.
- Arakaki A., Nakazawa A., Nemoto M., Mori T. and Matsunaga T. Formation of magnetite by bacteria and its application // J. R. Soc. Interface - 2008. -V. 5. - P. 977–999.
- Arendsen A. F., Verhagen M. F., Wolbert R. B., Pierik A. J., Stams A. J., Jetten M. S., et al. The dissimilatory sulfite reductase from Desulfosarcina variabilis is a desulforubidin containing uncoupled metalated sirohemes and S = 9/2 iron-sulfur clusters // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 10323-10330.
- Baker-Austin C., Dopson M. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles // Trends Microbiol. - 2007. - V. 15(4). - P. 165-171.

- Banks D., Karnachuk O. V., Kadnikov V. V., Watts M., Boyce A., Ivasenko D. A., Filenko R. A., Danilova E. V., Pimenov N. V., Gundersen P. Hydrochemical data report from sampling of polymetallic mines in Zaibaikalskii Krai, eastern Siberia, Russian Federation // NGU Rapport. - 2014. - 2014.035
- Barton L. L., Fauque G. D. Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria // Adv. Appl. Microbiol. - 2009. - V. 68. - P. 41-98.
- Baumgarten A., Redenius I., Kranczoch J., Cypionka H. Periplasmic oxygen reduction by Desulfovibrio species // Arch. Microbiol. - 2001. – V. 176. – P. 306-309.
- Bazylinski D. A., Frankel R. B., Biologically controlled mineralization in prokaryotes // Rev. Mineral. Geochem. – 2003. – V. 54. – P. 217-247.
- Benner S. G., Blowes D. W., Ptacek C. J. A full-scale porous reactive wall for prevention of acid mine drainage // Ground Water Monit. Remediation. - 1997. -V. 17. - P. 99-107.
- Beveridge T. J., Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization // Ann. Rev. Microbiol. - 1989. - V. 43. - P. 147-171.
- Bhagat M., Burgess J. E., Antunes A. P. M., Whiteley C. G., Duncan J. R. Precipitation of mixed metal residues from wastewater utilizing biogenic sulphide // Miner. Eng. - 2004. - V. 17. - P. 925–932.
- Bijmans M. F. M., de Vries E., Yang C. H., Buisman C. J. N., Lens P. N. L., Dopson M. Sulfate reduction at pH 4.0 for treatment of process and wastewaters // Biotechnol. Prog. - 2010. - V. 26. - P. 1029-1037.
- Bijmans M. F., Dopson M., Ennin F., Lens P. N., Buisman C. J. Effect of sulfide removal on sulfate reduction at pH 5 in a hydrogen fed gas-lift bioreactor // J. Microbiol. Biotechnol. - 2008. - V. 18. - P. 1809-1818.
- Boonstra J., Van Lier R., Janssen G., Dijkman H., Buisman C. Biological treatment of acid mine drainage // In R. Amils, A. Ballester (Eds.), Biohydrometallurgy and the Environment Toward the Mining of the 21st Century, Elsevier, Amsterdam. - 1999. - P. 559-567.

- Canfield D. E. The early history of atmospheric oxygen: homage to Robert A. Garrels. Annu. Rev // Sci. Earth Planet. 2005. V. 33. P. 1-36.
- 21. Canfield D. E., Raiswell R. The evolution of the sulfur cycle // Am. J. Sci. 1999.
 V. 299. P. 679-723.
- 22. Cao J., Zhang G., Mao Z., Fang Z., Yang C. Precipitation of valuable metals from bioleaching solution by biogenic sulfides // Minerals Engineering. 2009. V. 22. P. 289-295.
- Chen T. L., Siu L. K., Lee, Y. T., Chen C. P., Huang L. Y., Wu R. C. C., Cho W. L., Fung C. P. Acinetobacter baylyi as a Pathogen for Opportunistic Infection // Journal of Clinical Microbiology. 2008. V. 46 (9). P. 2938–2944.
- Cline J. D. Spectrophotometric determination of hydrogen sulphide in natural waters // Limnol. Oceanogr. - 1969. - V. 14. - P. 454–458.
- 25. Cypionka H. Oxygen respiration by Desulfovibrio species // Annu. Rev. Microbiol.
 2000. V. 54. P. 827-848.
- Cypionka H. Solute transport and cell energetics // In L. L. Barton (Ed.), Sulphate reducing bacteria. New York: Plenum Press. - 1995. – P. 151-184.
- Cypionka H., Widdel F., Pfennig N. Survival of sulfatereducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate-free oxygen sulfide gradients // FEMS Microbiol. Ecol. - 1985. - V. 31. - P. 39-45.
- DeLong E. F. Archaea in costal marine environments // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – V. 89. – P. 5685-5689.
- 29. DeLong E. F., Frankel R. B., Bazylinski D. A. Multiple evolutionary origins of magnetotaxis in bacteria // Science. 1993. V. 259. P. 803-806.
- Deppenmeier U. The membrane-bound electron transport system of Methanosarcina species // Journal of Bioenergetics and Biomembranes. - 2004. -V. 36. - P. 55-64.
- 31. Detmers J., Brüchert V., Habicht K. S., Kuever J. Diversity of sulfur isotope fractionations by sulfate-reducing prokaryotes // Appl. Environ. Microbiol. 2001.
 V. 67. P. 888-894.

- Dolla A., Fournier M., Dermoun Z. Oxygen defense in sulfate-reducing bacter // Journal of Biotechnology. – 2006. - V. 126. - P. 87-100.
- Donald R., Southam G. Low temperature anaerobic bacterial diagenesis of ferrous monosulfide to pyrite // Geochim Cosmochim Acta. - .1999. – V. 63. – P. 2019-2023.
- Eger P. Wetland treatment for trace metal removal from mine drainage: the importance of aerobic and anaerobic processes // Water Sci. Technol. 1994. V. 29. P. 249-256.
- Fauque G. D. Ecology of sulfate-reducing bacteria // In L. L. Barton (Ed.), Sulfate-Reducing Bacteria. Biotechnology Handbooks. New York: Plenum Press. - 1995. – V. 8. – P. 217-241.
- Fauque G. D., Barton L. L. Hemoproteins in dissimilatory sulfate- and sulfurreducing prokaryotes // Advances in Microbial Physiology. – 2012. – V. 60, - P. 1-90.
- Fauque G., LeGall J., Barton, L. L. Sulfate-reducing and sulfurreducing bacteria // In J. M. Shively, L. L. Barton (Eds.), Variations in Autotrophic Life. London: Academic Press Limited. - 1991. – P. 271-337.
- Fauque G., Ollivier B. Anaerobes: the sulfate-reducing bacteria as an example of metabolic diversity. In Microbial Diversity and Bioprospecting // In Bull A. T. (Eds.), Washington, DC: American Society for Microbiology. - 2004 - P. 169-176.
- 39. Feng D., Aldrich C., Tan H. Treatment of acid mine water by use of heavy metal precipitation and ion exchange // Miner. Eng. 2000. V. 13. P. 623-642.
- Ferris F. G., Fyfe W.S., Beveridge T.J. Bacteria as nucleation sites for authigenic minerals in a metalcontaminated lake sediment // Chem. Geol. 1987. V. 63. P. 225-232.
- 41. Fortin D, Beveridge T.J., Microbial sulfate reduction within sulfidic mine tailings: Formation of diagenetic Fe sulfides // Geomicrobiol. J. - 1997. - V. 14. - P. 1-21.
- Fournier M., Dermoun Z., Durand M. C., Dolla A. A new function of the Desulfovibrio vulgaris Hildenborough [Fe] hydrogenase in the protection against oxidative stress // J. Biol. Chem. - 2004. – V. 279. – P. 1787-1793.

- 43. Frazao C., Silva G., Gomes C. M., Matias P., Coelho R., Sieker L., Macedo S., Liu M. Y., Oliveira S., other authors. Structure of a dioxygen reduction enzyme from *Desulfovibrio gigas* // Nat. Struct. Biol. 2000. V. 7. P. 1041-1045.
- 44. Fritz G., Bu[°]chert T., Kroneck P. M. H. The function of the [4Fe-4S] clusters and FAD in bacterial and archaeal adenylylsulfate reductases. Evidence for flavincatalyzed reduction of adenosine 5'-phosphosulfate // The Journal of Biological Chemistry. - 2002. - V. 277. – P. 26066-26073.
- Frolov E. N., Kublanov I. V., Toshchakov S. V., Samarov N. I., Novikov A. A., Lebedinsky A. V., Bonch-Osmolovskaya E. A., Chernyh N. A. *Thermodesulfobium acidiphilum* sp. nov., a thermoacidophilic, sulfate-reducing, chemoautotrophic bacterium from a thermal site // Int J. System Evol. Microbiol. -2017. - V. 67. - P. 1482–1485.
- 46. Gavel O. Y., Bursakov S. A., Calvete J. J., George G. N., Moura J. J. G., Moura I. ATP sulfurylases from sulfate-reducing bacteria of the genus Desulfovibrio. A novel metalloprotein containing cobalt and zinc // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 16225-16232.
- Gibert O., De Pablo J., Luis Cortina J., Ayora C. Chemical characterisation of natural organic substrates for biological mitigation of acid mine drainage // Water Res. - 2004. - V. 38. - P. 4186-4196.
- Gilbert P., Abrecht M., Frazer B.H. The organic-mineral interface in biominerals // Rev. Mineral Geochem. - 2005. - V. 59. - P. 157-185.
- González-Toril E., Llobet-Brossa E., Casamayor E. O., Amann R., Amils R. Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River // Appl. Environ. Microbiol. - 2003 - V. 6. - P. 4853-4865.
- Gramp J. P. Formation of Ni- and Zn-Sulfides in Cultures of Sulfate-Reducing Bacteria / J. P. Gramp, J. M. Bigham, O. H. Tuovinen, K. Sasaki // Geomicrobiol. J. - 2007. – V. 24. – P. 609-614.
- Gramp J.P. Formation of Covellite (CuS) Under Biological Sulfate-Reducing Conditions / J.P. Gramp, K. Sasaki, J.M. Bigham, O.V. Karnachuk, O.H. Tuovinen // Geomicrobiol. J. 2006. – V.23. – P. 613-619.

- 52. Gramp, P.J. et al. Formation of Fe-sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria
 // Journal of Hazardous Materials. 2010. V. 175 (3). P. 1062-1067.
- Grande, J. A., Beltrán, R., Sáinz, A. et al. Acid mine drainage and acid rock drainage processes in the environment of Herrerías Mine (Iberian Pyrite Belt, Huelva-Spain) and impact on the Andevalo Dam // Env Geol. 2005. V. 47. P. 185.
- 54. Gray N. Environmental impact and remediation of acid mine drainage: a management problem // Environmental Geology. 1997. V. 30. P. 62.
- Gyure R. A., Konopka A., Brooks A., Doemel W. Microbial sulfate reduction in acidic (pH 3) strip-mine lakes // FEMS Microb. Ecol. – 1990. -V. 73. - P. 193-202.
- 56. Han Z., Zhao Y., Yan H., Zhao H., Han M., Sun B., Sun X., Hou F., Sun H., Han L., Sun Y., Wang J., Li H., Wang Y., Du H. Struvite precipitation induced by a novel sulfate-reducing bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* SRB4 isolated from river sediment // Geomicrobiol. J. 2015. V. 32. P. 868–877.
- 57. Hatchikian E. C. Desulfofuscidin: Dissimilatory, high-spin sulfite reductase of thermophilic, sulfate-reducing bacteria // Methods in Enzymology. - 1994. - V. 243. - P. 276-295.
- Hedderich R., Hamann N., Bennati M. Heterodisulfide reductase from methanogenic archaea: A new catalytic role for an iron-sulfur cluster // Biological Chemistry. - 2005. – V. 386. – P. 961-970.
- Heidelberg J. F., Seshadri R., Haveman S. A., Hemme C. L., Paulsen I. T., Kolonay J. F., Eisen J. A., Ward N., Methe B., Brinkac L. M., Daugherty S. C., Deboy R. T., Dodson R. J., Durkin A. S., Madupu R., Nelson W. C., Sullivan S. A., Fouts D., Haft D. H., Selengut J., Peterson J. D., Davidsen T. M., Zafar N., Zhou L. W., Radune D., Dimitrov G., Hance M., Tran K., Khouri H., Gill J., Utterback T. R., Feldblyum T. V., Wall J. D., Voordouw G., Fraser C. M. The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium Desulfovibrio vulgaris Hildenborough // Nature Biotechnology. - 2004. - V. 22 (5). - P. 554–559.

- Herbert R. B., Benner S. G., Pratt A. R., Blowes D. W. Surface chemistry and morphology of poorly crystalline iron sulfides precipitated in media containing sulfate-reducing bacteria // Chemical Geology. - 1998. - V. 144. - P. 87-97.
- Hiibel S. R., Pereyra L. P., Breazeal M.V.R., Reisman D.J., Reardon K.F., Pruden A. Effect of organic substrate on the microbial community structure in pilotscale sulfate-reducing biochemical reactors treating mine drainage // Environ. Eng. Sci. 2011. V. 28. P. 563-572.
- Hiibel S. R., Pereyra L. P., Inman L. Y., Tischer A., Reisman D. J., Reardon K. F., Pruden A. Microbial community analysis of two field-scale sulfate-reducing bioreactors treatingmine drainage Environ // Microbiol. - 2008. - V. 10. - P. 2087-2097.
- Huisman J. L., G. Schouten, Schultz C. Biologically produced sulphide for purification of process streams, effluent treatment and recovery of metals in the metal and mining industry // Hydrometallurgy. - 2006. - V. 83. - P. 106-113.
- Huisman J. L., Schouten G., Schultz C. Biologically produced sulphide for purification of process streams, effluent treatment and recovery of metals in themetal and mining industry // Hydrometallurgy. - 2006. - V. 83. - P. 106-113.
- Iftikhar A., Muhammad J.A., Zahir A.Z., Muhammad N., Birgit M., Angela S.; Cadmium-tolerant bacteria induce metal stress tolerance in cereals // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. - 2014. - V. 21(18). - P. 11054-11065.
- 66. Ikkert O. P., Gerasimchuk A. L., Bukhtiyarova P. A., Tuovinen O. H., Karnachuk O. V. Characterization of precipitates formed by H₂S-producing, Cu-resistant Firmicute isolates of *Tissierella* from human gut and *Desulfosporosinus* from mine waste // Antonie van Leeuwenhoek. 2013. V. 103. P. 1221-1234.
- Jameson E., Rowe O. F., Hallberg K. B., Johnson D. B. Sulfidogenesis and selective precipitation of metals at low pH mediated by *Acidithiobacillus* spp. and acidophilic sulfate-reducing bacteria // Hydrometallurgy. - 2010. - V. 104. - P. 488-493.

- Janssen A. Removal of hydrogen sulphide from wastewater and waste gases by biological conversion to elemental sulphur: colloidal and interfacial aspects of biologically produced sulphur particles [Text] / Janssen A., Lettinga G., De Keizer A. // Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects. – 1999. – V. 151. – P. 389– 397.
- 69. Janssen A., Lettinga G., De Keizer A. Removal of hydrogen sulphide from wastewater and waste gases by biological conversion to elemental sulphur: colloidal and interfacial aspects of biologically produced sulphur particles // Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects. - 1999. - V. 151. - P. 389-397.
- Jencarova J., Luptakova A., Jandacka P., Matysek D. The examination of biogenic and non-biogenic iron precipitates created by hydrogen sulphide // Journal of the Polish Mineral Engineering Society. - 2014. - V. 34(2). - P. 281-286.
- Johnson D. B. Geomicrobiology of extremely acidic subsurface environments // FEMS Microbiol. Ecol. - 2012. - V. 81. - P. 2-12.
- Johnson D. B., Ghauri M. A., McGinness S. Biogeochemical cycling of iron and sulphur in leaching environments // FEMS Microbiol. Rev. - 1993 - V. 11. - P. 63-70.
- Johnson D. B., Hallberg K. B. Acid mine drainage remediation options: a review // Sci. Total Environ. - 2005. - V. 338. - P. 3-14.
- Johnson D. B., Hallberg K. B. Carbon, iron and sulfur metabolism in acidophilic micro-organisms // Advances in Microbial Physiology – 2009a. - V. 54. - P. 202-256.
- 75. Johnson D. B., Jameson E., Rowe O., Wakeman K., Hallberg K. B. Sulfidogenesis at low pH by acidophilic bacteria and its potential for the selective recovery of transition metals from mine waters // Adv. Mater. Res. - 2009b. - V. 71. - P. 693-696.
- Jong T., Parry D. L. Microbial sulfate reduction under sequentially acidic conditions in an upflow anaerobic packed bed bioreactor // Water Research. -2006. - V. 40. - P. 2561-2571.

- 77. Junier P., Junier T., Podell S., Sims D. R., Detter J. C., Lykidis A., Han C. S., Wiqqinton N. S., Gaasterland T., Bernier-Latmani R. The genome of the Grampositive metal- and sulfate-reducing bacterium *Desulfotomaculum reducens* strain MI-1 // Environmental Microbiology. - 2010. - V. 12. - P. 2738-2754.
- Kaksonen A. H., Puhakka J. A. Sulfate Reduction Based Bioprocesses for the Treatment of Acid Mine Drainage and the Recovery of Metals // Eng. Life Sci. -2007. - V. 7(6). - P. 541–564.
- Kaksonen A., Riekkola-Vanhanen M. L., Puhakka J. Optimization of metal sulphide precipitation in fluidized-bed treatment of acidic wastewater // Water Research. - 2003. - V. 37 (2). - P. 255-266.
- Karnachuk O. V., Kurochkina S. Y., Nicomrat D., Frank Y. A., Ivasenko D. A., Phyllipenko E. A., Tuovinen O. H. Copper resistance in *Desulfovibrio* strain R2 // Antonie Van Leeuwenhoek. - 2003 – V. 83. P. 99–106.
- Karnachuk O. V., Kadnikov V. V., Panova I. A., Mardanov A. V., Beletsky A. V., Danilova E. V., Avakyan M. R., Ravin N. V. Genome sequence of the copper resistant and acid-tolerant *Desulfosporosinus* sp. BG isolated from the tailings of a molybdenum-tungsten mine in the Transbaikal area // Genom Data. - 2017. - V. 11. - P. 106–108.
- Karnachuk O. V., Mardanov A. V., Avakyan M. R., Kadnikov V. V., Vlasova M., Beletsky A. V., Gerasimchuk1A. L., Ravin N. V. Draft genome sequence of the first acid-tolerant sulfate-reducing deltaproteobacterium Desulfovibrio sp. TomC having potential for minewater treatment // FEMS Microbiology Letters. – 2015. – P. 362.
- Karnachuk O. V., Pimenov N. V., Yusupov S. K., Frank Y. A., A.H., Kaksonen J. A. Puhakka, Ivanov M. V., Lindström E. B., Tuovinen O.H. Sulfate reduction potential in sediments in the Norilsk Mining area, Northern Siberia // Geomicrobiol. J. 2005. V. 22 (11) P.25.
- 84. Karnachuk O. V., Sasaki K., Gerasimchuk A. L. Sukhanova O., Ivasenko D. A., Kaksonen A. H., Puhakka J. A., and Tuovinen O.H. Precipitation of Cu-sulfides

by copper-tolerant *Desulfovibrio* isolates // Geomicrobiol. J. – 2008. – V. 25. – P. 219-227.

- Karnachuk O.V., Gerasimchuk A.L., Banks D., Frengstad B., Stykon G.A., Kaksonen A.H., Puhakka J, Ianenko A.S., Pimenov N.V. Sulfur metabolite bacteria from waste water of gold miner tale-depot in Kuzbass // Mikrobiologiia. -2009. - V. 78(4) - P. 535-544.
- 86. Kawaguchi R., Burgess J. G, Sakaguchi T., Takeyama H., Thornhill R. H., Matsunaga T. Phylogenetic analysis of a novel sulfate-reducing magnetic bacterium, RS-1, demonstrates its membership of the delta-Proteobacteria // FEMS Microbiol. Lett. - 1995. - V. 126. -P. 277–282.
- Kawasaki S., Sakai Y., Takahashi T., Suzuki I., Niimura Y. O2 and reactive oxygen species detoxification complex, composed of O2-responsive NADH: rubredoxin oxidoreductaseflavoprotein A2-desulfoferrodoxin operon enzymes, rubperoxin, and rubredoxin, in Clostridium acetobutylicum // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 1021-1029.
- Keim C. N., Abreu F., Lins U., de Barros H. L., Farina M. Cell organization and ultrastructure of a magnetotactic multicellular organism // J. Struct. Biol. - 2004. -V. 145. - P. 254-262.
- Keller L. L., Wall, J. D. Genetics and molecular biology of the electron flow for sulfate respiration in Desulfovibrio // Front. Microbiol. - 2011. - V. 2. - P. 135.
- 90. Kijjanapanich P., Pakdeerattanamint P., Lens A. Organic substrates as electron donors in permeable reactive barriers for removal of heavy metals from acid mine drainage. Annachhatre, Environ // Technol. - 2012. - V. 33. - P. 2635-2644.
- 91. Kim J, Chon H Pollution of a water course impacted by acid mine drainage in the Imgok creek of the Gangreung coal field, Korea // Appl. Geochem. 2001. V. 16. P. 1387-1396.
- Kimura S., Hallberg K. B., Johnson D. B. Sulfidogenesis in low pH (3.8-4.2) media by a mixed population of acidophilic bacteria // Biodegradation. 2006. V. 17. P. 57-65.

- 93. Kitamura, M., Mizugai, K., Taniguchi, M., Akutsu, H., Kumagai, I. & Nakaya, T. A gene encoding a cytochrome c oxidase-like protein is located closely to the cytochrome c-553 gene in the anaerobic bacterium, Desulfovibrio vulgaris (Miyazaki F) // Microbiol. Immunol. 1995. V. 39. P. 75-80.
- 94. Kolmert A. D. B., Johnson. J. Remediation of acidic waste waters using immobilised, acidophilic sulfate-reducing bacteria. Chem. Technol // Biotechnol. – 2001. - V. 76. - P. 836-843.
- Konhauser K. O. Diversity of bacterial iron mineralization // Earth-Sci. Rev. -1998. - V. 43. - P. 91-121.
- Konings W. N., Albers S. V., Koning S., Driessen A. J. The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments. Antonie Van Leeuwenhoek. - 2002. - V. 81. - P. 61-72.
- 97. Koschorreck M. Microbial sulphate reduction at a low pH // FEMS Microbiol.
 Ecol. 2008. V. 64. P. 329–342.
- Koschorreck M. Microbial sulphate reduction at a low pH // FEMS Microbiol. Ecol. - 2008. - V.64. - P. 329-342.
- Koschorreck M., Wendt-Potthoff K., Geller W. Microbial sulfate reduction at low pH in sediments of an acidic lake in Argentina // Environ. Sci. Technol. – 2003. -V. 37. - P. 1159-1162.
- 100. Krekeler, D., Sigalevich, P., Teske, A., Cypionka, H., Cohen, Y. A sulfatereducing bacterium from the oxic layer of amicrobial mat from Solar Lake (Sinai), *Desulfovibrio oxyclinae* sp. nov. // Arch. Microbiol. - 1997. - V. 167. - P. 369-375.
- 101. Kusel K., Karnholz A., Trinkwalter T., Devereux R., Acker G. & Drake H. L. Physiological ecology of *Clostridium glycolicum* RD-1, an aerotolerant acetogen isolated from sea grass roots // Appl. Environ. Microbiol. - 2001. - V. 67. - P. 4734-4741.
- 102. Kusel K., Roth U., Trinkwalter T., Peiffer S. Effect of pH on the anaerobic microbial cycling of sulfur in mining-impacted freshwater lake sediments // Environ. Exp. Bot. - 2014. - V. 6. - P. 213-223.

- 103. Labrenz M., Banfield J. F. Sulfate-reducing bacteria-dominated biofilms that precipitate ZnS in a subsurface circumneutral-pH mine drainage system // Microb. Ecol. - 2004. - V. 47(3). - P. 205-217.
- 104. Labrenz M., Druschel G. K., Thomsen-Ebert T., Gilbert B., Welch S. A., Kemner K. M., Logan G. A., Summons R. E., De Stasio G., Bond P. L., Lai B., Kelly S. D., Banfield J. F. Formation of sphalerite (ZnS) deposits in natural biofilms of sulfate-reducing bacteria // Science. 2000. V. 290(5497). P. 1744-1747.
- 105. Lai C., Lua M., Chen L. Metal sulfide nanostructures: synthesis, properties and applications in energy conversion and storage // J. Mater. Chem. - 2012. - V. 22. -P. 19-30.
- 106. Lampreia J., Fauque G., Speich N., Dahl C., Moura I., Trüper H. G., Moura J. J. G. Spectroscopic studies on APS reductase isolated from the hyperthermophilic sulfate-reducing archaebacterium Archaeoglobus fulgidus // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1991. - V. 181. - P. 342-347.
- 107. Lampreia J., Pereira A. S., Moura J. J. G. Adenylylsulfate reductases from sulfatereducing bacteria // Methods in Enzymology. 1994. V. 243. P. 241-260.
- 108. Lamrabet O., Pieulle L., Aubert C., Mouhamar F., Stocker P., Dolla A. and Brasseur G. Oxygen reduction in the strict anaerobe Desulfovibrio vulgaris Hildenborough: characterization of two membrane-bound oxygen reductases // Microbiology. - 2011. - V. 157. - P. 2720-2732.
- 109. Le Fourn, C., Fardeau, M. L., Ollivier, B., Lojou, E., Dolla, A. The hyperthermophilic anaerobe Thermotoga maritima is able to cope with limited amount of oxygen: insights into its defence strategies // Environ. Microbiol. -2008. - V. 10. - P. 1877-1887.
- 110. Lee J. P., Peck H. D. Purification of the enzyme reducing bisulfite to trithionate from Desulfovibrio gigas and its identification as desulfoviridin // Biochemical and Biophysical Research Communications. - 1971. - V. 45. - P. 583-589.
- 111. Lee J. P., Yi C. S., LeGall J., Peck H. D. Isolation of a new pigment, Desulforubidin, from Desulfovibrio desulfuricans (Norway strain) and its role in sulfite reduction // Journal of Bacteriology. - 1973. - V. 115. - P. 453-455.

- 112. Lee Y. J., Romanek C. S., Wiegel J. Desulfosporosinus youngiae sp. nov., a sporeforming, sulfate-reducing bacterium isolated from a constructed wetland treating acid mine drainage // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2009. - V. 59. - P. 2743-2746.
- 113. LeGall J., Fauque G. Dissimilatory reduction of sulfur compounds // In A. J. B. Zehnder (Ed.), Biology of Anaerobic Microorganisms. New York: Wiley. 1998.
 P. 587-639.
- 114. Lemos R. S., Gomes C. M., Santana M., LeGall J., Xavier A. V., Teixeira, M. The 'strict' anaerobe Desulfovibrio gigas contains a membrane-bound oxygen-reducing respiratory chain // FEBS Lett. - 2001. - V. 496. - P. 40-43.
- 115. Lins U., Farina M. Organization of cells in magnetotactic multicellular aggregates
 // Microbiol. Res. 1999. V. 154. P. 9-13
- 116. Lobo S. A., Almeida C. C., Carita J. N., Teixeira M., Saraiva L. M. The haemcopper oxygen reductase of Desulfovibrio vulgaris contains a dihaem cytochrome c in subunit II // Biochim. Biophys. Acta. - 2008. - V. 1777. - P. 1528-1534.
- 117. Lopez-Archilla A.I., Marin I., Amils R. Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto River, Spain // Microb. Ecol. – 2001. - V. 41. - P. 20-35.
- 118. Lopez-Cortès A., Bursakov S., Figueiredo A., Thapper A.E., Todorovic S., Moura J.J.G., Ollivier B., Moura I. and Fauque G. Purification and preliminary characterization of tetraheme cytochrome c3 and adenylylsulfate reductase form the peptidolytic sulfate-reducing bacterium Desulfovibrio aminophilus // Bioinorg. Chem. Appl. 2005. V. 3. P. 81-91.
- 119. Ludwig W., Strunk O., Westram R. et al. ARB: a software environment for sequence data // Nucleic. Acids Res. 2004. V. 32. P. 1363-1371.
- 120. Magot M., Basso O., Tardy-Jacquenod C., Caumette P. *Desulfovibrio bastinii* sp. nov. and *Desulfovibrio gracilis* sp. nov., moderately halophilic, sulfate-reducing bacteria isolated from deep subsurface oilfield water // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54 (5). P. 1693-7.

- 121. Mardanov A. V., Panova I. A., Beletsky A. V., Avakyan M. R., Kadnikov V. V., Antsiferov D. V., Banks D., Frank Y. A., Pimenov N. V., Ravin N. V., Karnachuk O.V. Genomic insights into a new acidophilic, copper-resistant *Desulfosporosinus* isolate from the oxidized tailings area of an abandoned gold mine // FEMS Microbiology Ecology. - 2016. - V. 92(8). - P. 1-36.
- 122. Marschall C., Frenzel C., Cypionka H. Influence of oxygen on sulphate reduction and growth on sulfate-reducing bacteria // Arch. Microbiol. - 1993. - V. 159. - P. 168-173.
- 123. Matin A. Keeping a neutral cytoplasm; the bioenergetics of obligate acidophiles // FEMS Microbiol. Rev. - 1990. - V. 75. - P. 307–318.
- 124. Mayeux B., Fardeau M., Bartoli-Joseph M., Casalot L., Vinsot A., Labat M. *Desulfosporosinus burensis* sp. nov., a spore-forming, mesophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep clay environment // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. -2013. - V. 63. - P. 593-598.
- 125. Meier J., Piva A., Fortin D. Enrichment of sulfate-reducing bacteria and resulting mineral formation in media mimicking pore water metal ion concentrations and pH conditions of acidic pit lakes // FEMS Microbiol Ecol - 2012. - V. 79. - P. 69–84.
- 126. Mersmann A. Crystallization and precipitation // Chem. Eng. Process. 1999. V.38. P. 345-353.
- 127. Milucka J., Ferdelman T. G., Polerecky L., Franzke D., Wegener G., Schmid M., et al. Zero-valent sulphur is a key intermediate in marine methane oxidation // Nature. 2012. V. 491. P. 541–546.
- 128. Moreau J. W., Webb R. I., Banfield J. F. Ultrastructure, aggregation-state, and crystal growth of biogenicn nanocrystalline sphalerite and wurtzite // Am. Mineral. 2004. V. 89 P. 950-960.
- 129. Moreau J. W., Zierenberg R. A., Banfield J. F. Diversity of dissimilatory sulfite reductase genes (dsrAB) in a salt marsh impacted by long-term acid mine drainage // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. - V. 76 - P. 4819-4828.

- 130. Mori K., Kim H., Kakegawa T., Hanada S. A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: *Thermodesulfobiaceae* fam. nov., *Thermodesulfobium narugense*, gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolate from a hot spring // Extremophiles. – 2003. - V. 7. - P. 283-290.
- 131. Moura I., LeGall J., Lino A. R., Peck H. D., Fauque G., Xavier A. V., et al. Characterization of two dissimilatory sulfite reductases (desulforubidin and desulfoviridin) from the sulfate-reducing bacteria—M€ossbauer and EPR studies // Journal of the American Chemical Society. - 1988. – V. 110. – P. 1075-1082.
- 132. Muller A. L., Kjeldsen K. U., Rattei T., Pester M., Loy A. Phylogenetic and environmental diversity of DsrAB-type dissimilatory (bi)sulfite reductases // The ISME Journal. - 2015. - V. 9. - №5. - P. 1152-1165.
- 133. Mussmann, M., Ishii, K., Rabus, R., Amann, R. Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea // Environ. Microbiol. - 2005. – V. 7. – P. 405-418.
- 134. Muyzer G., Stams A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria // Nat. Rev. Microbiol. - 2008. - V. 6. - P. 441-454.
- 135. Nancucheo I., Johnson D. B. Selective removal of transition metals from acidic mine waters by novel consortia of acidophilic sulfidogenic bacteria // Microb. Biotechnol. – 2012. - V. 5. - P. 34-44.
- 136. Neculita C. M., Zagury G. J., Bussière B. Passive treatment of acid mine drainage in bioreactors using sulfate-reducing bacteria // Journal of Environmental Quality. 2007. V. 36 (1). P. 1-16.
- 137. Oliveira T. F., Franklin E., Afonso J. P., Khan A. R., Oldham N. J., Pereira I. A. C., et al. Structural insights into dissimilatory sulfite reductases: Structure of desulforubidin from Desulfomicrobium norvegicum // Frontiers in Microbiology. 2011. V. 2. P. 71.
- 138. Oliveira T. F., Vonrhein C., Matias P. M., Venceslau S. S., Pereira I. A. C., Archer M. The crystal structure of *Desulfovibrio vulgaris* dissimilatory sulfite reductase bound to DsrC provides novel insights into the mechanism of sulfate respiration // The Journal of Biological Chemistry. - 2008. - V. 283. - P. 34141-34149.

- 139. Ollivier B., Cayol J. L., Fauque G. Sulphate-reducing bacteria from oil field environments and deep-sea hydrothermal vents // In L.L. Barton & W.A. Hamilton (Eds.), Sulphate-Reducing Bacteria—Environmental and Engineered Systems. Cambridge, UK: Cambridge University Press. - 2007. - P. 305-328.
- 140. Orell A., Frols S., Albers S. V. Archaeal biofilms: the great unexplored // Annu. Rev. Microbiol. - 2013. - V. 67. - P. 337–354.
- 141. Orell A., Navarro C. A., Arancibia R., Mobarec J. C., Jerez C. A. Life in blue: copper resistance mechanisms of bacteria and archaea used in industrial biomining of minerals // Biotechnol. Adv. - 2010. - V. 28. - P. 839–848.
- 142. Pallud C., Van Cappellen P. Kinetics of microbial sulfate reduction in estuarine sediments // Geochimica et Cosmochimica Acta. - 2006. – V. 70. – P. 1148-1162.
- 143. Parey K., Fritz G., Ermler U., Kroneck P. M. H. Conserving energy with sulfate around 100°C - Structure and mechanism of key metal enzymes in hyperthermophilic Archaeoglobus fulgidus // Metallomics. - 2013. - V. 5. - P. 302-317.
- 144. Parey K., Warkentin E., Kroneck P. M. H., Ermler, U. Reaction cycle of the dissimilatory sulfite reductase from Archaeoglobus fulgidus // Biochemistry. -2010. – V. 49. – P. 8912-8921.
- 145. Peck H. D. Jr. The ATP-dependent reduction of sulfate with hydrogen in extracts of Desulfovibrio desulfuricans // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 1959. - V. 45. -P. 701-708.
- 146. Pereira I. A. C., Ramos A. R., Grein F., Marques M. C., da Silva S. M., Venceslau S. A comparative genomic analysis of energy metabolism in sulfate-reducing bacteria and archaea // Front. Microbiol. 2011. V. 2. P. 69.
- 147. Pester M., Brambilla E., Alazard D., Rattei T., Weinmaier T., Han J., Lucas S., Lapidus A. et al. Complete genome sequences of *Desulfosporosinus orientis* DSM765^T, *Desulfosporosinus youngiae* DSM17734^T, *Desulfosporosinus meridiei* DSM13257^T, and *Desulfosporosinus acidiphilus* DSM22704^T // J. Bacteriol. 2012. V. 194(22). P. 6300-6301.

- 148. Pfennig N. Metabolic diversity among the dissimilatory sulfate-reducing bacteria // Antonie Van Leeuwenhoek. - 1989. - V. 56. - P. 127-138.
- 149. Pierik A. J., & Hagen W. R. Sj9/2 EPR signals are evidence against coupling between the siroheme and the Fe/S cluster prosthetic groups in Desulfovibrio vulgaris (Hildenborough) dissimilatory sulfite reductase // European Journal of Biochemistry. - 1991. - V. 195. - P. 505-516.
- 150. Pires R. H., Lourenco A. I. C., Morais F., Teixeira M., Xavier A. V., Saraiva L. M., et al. A novel membrane-bound respiratory complex from Desulfovibrio desulfuricans ATCC 27774 // Biochimica et Biophysica Acta. 2003. V. 1605. P. 67-82.
- 151. Pires R. H., Venceslau S. S., Morais F., Teixeira M., Xavier A.V., Pereira I. A., Characterization of the Desulfovibrio desulfuricans ATCC 27774 DsrMKJOP complex — a membrane-bound redox complex involved in the sulfate respiratory pathway // Biochemistry. - 2006. - V. 45. - P. 249-262.
- 152. Posfai M., Moskowitz B. M., Arato B., Schuler D., Flies C., Bazylinski D. A. & Frankel R. B. Properties of intracellular magnetite crystals produced by *Desulfovibrio magneticus* strain RS-1 // Earth Planet. Sci. Lett. - 2006. - V. 249. -P. 444-455.
- 153. Postgate J.R. The sulphate-reducing bacteria // Cambridge, England: Cambridge University Press. 1984.
- 154. Rabus R., Hansen T.A., Widdel, F. Dissimilatory sulfate- and sulfurreducing prokaryotes // In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.), The Prokaryotes. Vol. 2. Berlin: Springer. - 2006. - P. 659-768.
- 155. Rabus R., Strittmatter A. Functional genomics of sulphate-reducing bacteria // In L. L. Barton, W. A. Hamilton (Eds.), Sulphate-reducing bacteria: Environmental and engineered systems. Cambridge: Cambridge University Press. - 2007. - P. 117-140.

- 156. Rabus R., Venceslau S. S., Wöhlbrand L., Voordouw G., Wall J. D., Pereira I. A. A post-genomic view of the ecophysiology, catabolism and biotechnology relevance of sulfate-reducing prokaryotes // Advances in Microbial Physiology. -2015. - V. 66. - P. 55-321.
- 157. Ramamoorthy S., Sass H., Langner H., Schumann P., Kroppenstedt R., Spring S., Overmann J., Rosenzweig R. *Desulfosporosinus lacus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from pristine freshwater lake sediments // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2006. - V. 56. - P. 2729-2736.
- 158. Ramel F., Brasseur G., Pieulle L., Valette O., Hirschler-Rea A., Fardeau M. L., Dolla A. Growth of the obligate anaerobe Desulfovibrio vulgaris Hildenborough under continuous low oxygen concentration sparging: impact of the membranebound oxygen reductases // PLOS ONE - 2015. -10:e0123455
- 159. Ramos A. R., Keller K. L., Wall J. D., Pereira I. A. C. The membrane QmoABC complex interacts directly with the dissimilatory adenosine 5'-phosphosulfate reductase in sulfate reducing bacteria // Frontiers in Microbiology. 2012. V. 3. P. 137.
- 160. Rasmussen K., Lindegaard C. Effects of Iron Compounds on Macroinvertebrate Communities in a Danish Lowland River System // Water Research. – 1998. – V. 22 (9). – P. 1101-1108.
- 161. Ravenschlag K., Sahm K., Knoblauch C., Jørgensen B. B. & Amann R. Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine arctic sediments // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – V. 66. – P. 3592-3602.
- 162. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // J. Cell Biology. 1963. – № 17. – P. 208-212.
- 163. Rickard D., Butler I. B., Oldroyd A. A novel iron sulphide mineral switch and its implications for Earth and planetary science // Earth. Planet. Sci. Lett. - 2001. - V. 189. - P. 85-91.

- 164. Rowe O. F., Sanchez-Espana J., Hallberg K. B., Johnson D. B. Microbial communities and geochemical dynamics in an extremely acidic, metal-rich stream at an abandoned sulfide mine (Huelva, Spain) underpinned by two functional primary production systems // Environ. Microbiol. – 2007. - V. 9. - P. 1761-1771.
- 165. Sakaguchi T., Arakaki A., Matsunaga T. Desulfovibrio magneticus sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium that produces intracellular single-domain-sized magnetite particles // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2002. - V. 52. - P. 215–221.
- 166. Sakaguchi T., Burgess J. G., Matsunaga T. Magnetite formation by a sulphatereducing bacterium // Nature (Lond.). - 1993. - V. 365. - P. 47–49.
- 167. Sánchez-Andrea I., Sanz J. L., Bijmans M. F., Stams A. J. Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage // J. Hazard. Mater. – 2014. - V. 269 - P. 98-109.
- 168. Sánchez-Andrea I., Stams A. J. M., Hedrich S., Nancucheo I., Johnson D. B. *Desulfosporosinus acididurans* sp. nov.: an acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acidic sediments // Extremophiles. – 2015. – V. 19 – P. 39–47.
- 169. Sánchez-Andrea I., Stams A. J., Amils R., Sanz J. L. Enrichment and isolation of acidophilic sulfate-reducing bacteria from Tinto River sediments // Environ. Microbiol. Rep. – 2013. - V. 5. - P. 1758-2229.
- 170. Sanchez-Andrea I., Triana D., Sanz J. L. Bioremediation of acid mine drainage coupled with domestic wastewater treatment // Water Sci. Technol. – 2012. - V. 66(11). - P. 2425-2431.
- 171. Santana, M. Presence and expression of terminal oxygen reductases in strictly anaerobic sulfate-reducing bacteria isolated from salt-marsh sediments // Anaerobe. - 2008. – V. 14. – P. 145-156.
- 172. Santos, H., Fareleira, P., Xavier, A. V., Chen, L., Liu, M. Y., LeGall, J. Aerobic metabolismof carbon reserves by the "obligate anaerobe" *Desulfovibrio gigas //* Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. V. 195. P. 551-557.
- 173. Sass H., Berchtold M., Branke J., Konig H., Cypionka H., Babenzien H.-D. Psychrotolerant sulfate-reducing bacteria from an oxic freshwater sediment,

description of *Desulfovibrio cuneatus* sp. nov. and *Desulfovibrio litoralis* sp. nov. //Syst. Appl. Microbiol. - 1998 - V. 21. - P. 212-219.

- 174. Sass H., Cypionka H., Babenzien H.-D. Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin // FEMS Microbiol. Ecol. 1997. V. 22. P. 245-255.
- 175. Schultze-Lam S., Fortin D., Davis B. S., Beveridge T. J. Mineralization of bacterial surfaces // Chem. Geol. 1996. V. 132. P. 171-181.
- 176. Sen A. M., Johnson, D. B. Acidophilic sulphate-reducing bacteria: cultre, isolation and characterization [Text] // In: UKEN '99: Meeting Abstracts. University of Exeter. - 1999.
- 177. Senko J. M., Zhang G., McDonough J. T., Brun M. A., Burgos W. D. Metal reduction at low pH by a *Desulfosporosinus* species: implications for the biological treatment of acidic mine drainage // Geomicrobiol. J. - 2009. - V. 26. - P. 71–82.
- 178. Shen Y., Buick R., Canfield D. E. Isotopic evidence for microbial sulphate reduction in the early Archaean era// Nature. 2001. V. 410. P. 77-81.
- 179. Sierra-Alvarez R., Karri S., Freeman S., Field J. A. Biological treatment of heavy metals in acid mine drainage using sulfate reducing bioreactors // Water Science & Technology. – 2006. - V. 54 (2). - P. 179-185
- 180. Silva S. M., Pacheco I., Pereira I. A. C., Electron transfer between periplasmic formate dehydrogenase and cytochromes c in Desulfovibrio desulfuricans ATCC 27774 // J. Biol. Inorg. Chem. - 2012. – V. 17. – P. 831-838.
- 181. Simmons S. L., Sievert S. M., Frankel R. B., Bazylinski D. A., Edwards K. J. Spatiotemporal distribution of marine magnetotactic bacteria in a seasonally stratified coastal salt pond // Appl. Environ. Microbiol. - 2004. - V. 70. - P. 6230-6239.
- 182. Sitte J., Pollok K., Langenhorst F., Küsel K., Nanocrystalline nickel and cobalt sulfides formed by a heavy metal-tolerant, sulfate-reducing enrichment culture // Geomicrobiol. J. – 2013. – V. 30 (36) - 47
- 183. Skousen J. A Handbook of Technologies for Avoidance and Reclamation of Acid Mine Drainage // West Virginia University. Morgantown Wv: NMLRC. - 1998.

- 184. Tabak H. H., Scharp R., Burckle J., Kawahara F. K., Govind R. Advances in biotreatment of acid mine drainage and biorecovery of metals: 1. Metal precipitation for recovery and recycle // Biodegradation. - 2003. - V. 14. - P. 423-436.
- 185. Tarpgaard, I. H., Roy, H., & Jørgensen, B. B. Concurrent low- and high-affinity sulfate reduction kinetics in marine sediment // Geochimica et Cosmochimica Acta. - 2011. – V. 75. – P. 2997-3010.
- 186. Teske A., Ramsing N. B., Habicht K., Fukui M., Ku⁻ ver J., Jørgensen B. B., Cohen Y. Sulfate-reducing bacteria and their activities in cyanobacterial mats of Solar Lake (Sinai, Egypt) // Appl. Environ. Microbiol. - 1998. – V. 64. – P. 2943-2951.
- 187. Thauer R. K., Jungermann K., Decker, K. Energy-conservation in chemotropic anaerobic bacteria // Bacteriological Reviews. - 1997. - V. 41. - P. 100-180.
- 188. Thauer R. K., Stackebrandt E., Hamilton W. A. Energy metabolism and phylogenetic diversity of sulphate-reducing bacteria // In L. L. Barton, W. A. Hamilton (Eds.), Sulphate-reducing bacteria: Environmental and engineered systems. Cambridge: Cambridge University Press. - 2007. - P. 1-37.
- 189. Tuttle J. H., Dugan P. R., Macmillan C. B., Randles C. I. Microbial dissimilatory sulfur cycle in acid mine water // J. Bacteriol. – 1969. - V. 97. P. 594-602.
- 190. Undeen A. H., Vavra J. I. Research methods for entomopathogenic Protozoa. In: Lacey LA ed. Manual of techniques in insect pathology. San Diego, Academic Press, 1997. - P. 117-151.
- 191. Valls M., Lorenzo V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution // FEMS Microbiol. - 2002. - V. 26. -P. 327-338.
- 192. Van Houten R.T., Pol L.W.H., Lettinga G. Biological sulphate reduction using gas-lift reactors fed with hydrogen and carbon dioxide as energy and carbon source // Biotechnol. Bioeng - 1994. - V. 44. - P. 586-594.

- 193. Veeken A. H. M., Akoto L., Hulshoff Pol L. W., Weijma J. Control of the sulfide (S2–) concentration for optimal zinc removal by sulfide precipitation in a continuously stirred tank reactor // Water Res. - 2003. - V. 37. - P. 3709-3717.
- 194. Venceslau S. S., Stockdreher Y., Dahl C., & Pereira I. A. C. The "bacterial heterodisulfide" DsrC is a key protein in dissimilatory sulfur metabolism // Biochimica et Biophysica Acta. - 2014. – V. 1837. – P. 1148-1164.
- 195. Vile M. A., Wieder R. K. Alkalinity generation by Fe(III) reduction versus sulfate reduction in wetlands constructed for acid mine drainage treatment // Water Air Soil Pollut. - 1993. - V. 69. - P. 425-441.
- 196. Wächtershäuser G. Chemoautotrophic origin of life: the iron-sulfur world hypothesis // In L. L. Barton, M. Mandl, A. Loy (Eds.), Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective. Dordrecht, The Netherlands: Springer Science Buisness Media B.V. - 2010. – P. 1-36.
- 197. Wagner M., Roger A.J., Flax J.L., Brusseau G.A., Stahl D.A. Phylogeny of dissimilatory sulfate reducers supports an early origin of sulfate respiration // J. Bacteriol. - 1998. – V. 180. – P. 2975-2982.
- 198. Watson J. H. P., Cressey B. A., Roberts A. P., Ellwood D. C., Charnock J. M., Soper A. K. Structural and magnetic studies on heavy-metal-adsorbing iron sulphide nanoparticles produced by sulphate-reducing bacteria // J. Magn. Magn. Mat. - 2000. - V. 214. - P. 13-30.
- 199. Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 697-703.
- 200. White C., Gadd G. M. Copper accumulation by sulfate-reducing bacterial biofilms // FEMS Microbiol. Lett. - 2000. - V. 183(2). - P. 313-318.
- 201. Widdel F. Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria // In A. J. B. Zehnder (Ed.), Biology of anaerobic microorganisms. John Wiley & Sons, New York. – 1988. - P. 469-585.

- 202. Widdel F. The genus *Desulfotomaculum* // In A. Balows, H. G. Triiper, M. Dworkin, W. Harder, K. H. Schleifer (Eds.) The Prokaryotes Springer-Verlag 1992. P. 1792-1799.
- 203. Widdel F., Bak F. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria // The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. / Eds. Balows A et al., 2nd edition, Berlin: Springer-Verlag. 1992. – P. 3352-3378.
- 204. Widdel F., Hansen T.A. The dissimilatory sulfate-and sulfur-reducing bacteria // In F. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K. H. Schleifer (Eds.), (2nd edn.). The Prokaryotes. V. 1. New York: Springer-Verlag. 1992. P. 583-624.
- 205. Wildschut J. D., Lang R. M., Voordouw J. K. & Voordouw G. Rubredoxin: oxygen oxidoreductase enhances survival of Desulfovibrio vulgaris Hildenborough under microaerophilic conditions // J. Bacteriol. - 2006. – V. 188. – P. 6253-6260.
- 206. Wolfe B. M., Lui S. M., Cowan J. A. Desulfoviridin, a multimeric-dissimilatory sulfite reductase from Desulfovibrio vulgaris (Hildenborough). Purification, characterization, kinetics and EPR studies // European Journal of Biochemistry. -1994. – V. 223. – P. 79-89.
- 207. Wolin E. A., Wolin M. J., Wolfe R. S. Formation of methane by bacterifl extracts // The Journal of Biological Chemistry. - 1963. - V. 238. - P. 2882-2888.
- 208. Wolthers M., Van der Gaast S. J., Rickard D. The structure of disordered mackinawite // Am Mineral. 2003. V. 88. P. 2007-2015.
- 209. Wu X., Wong Z. L., Sten P., Engblom S., Österholm P., Dopson. Microbial community potentially responsible for acid and metal release from an Ostrobothnian acid sulfate soil // FEMS Microbiol. Ecol. - 2013. - V. 84 - P. 555-563.
- 210. Younger P. L., Jayaweera A., Elliot A., Wood R., Amos P., Daugherty A. J., Martin A., Bowden L., Aplin A. C., Johnson D. B. Passive treatment of acidic mine waters in subsurface-flow systems: exploring RAPS and permeable reactive barriers // Land Contam. Reclamat. - 2003. - V. 11. - P. 127-135.

- 211. Zane G. M., Yen H. C., Wall J. D. Effect of the deletion of qmoABC and the promoter-distal gene encoding a hypothetical protein on sulfate reduction in Desulfovibrio vulgaris Hildenborough // Applied and Environmental Microbiology. - 2010. – V. 76. – P. 5500-5509.
- 212. Карначук О. В., Герасимчук А. Л., Бэнкс Д., Френгстадт Б., Стыкон Г. А., Тихонова З. Л., Каксонен А. Х., Пухакка Я А., Яненко А. С., Пименов Н. В.. Бактерии цикла серы в осадках хвостохранилища добычи золота в Кузбассе // Микробиология. – 2009. - Т. 78. - № 4. - С. 483-491.
- 213. Карначук О.В., Курганская И.А., Авакян М.Р., Франк Ю.А., Иккерт О.П., Филенко Р.А., Данилова Э.В., Пименов Н.В. Ацидофильный *Desulfosporosinus* из окисленных отходов добычи металлов в забайкальском крае // Микробиология. - 2015. - Т. 84 (5). - С. 595.
- 214. Карупу В.Я. Электронная микроскопия. Киев: «Вища школа». 1984. С. 208.
- 215. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих Под. ред. Ю.В. Полякова. // М: «Мир». 1975. С. 326.
- 216. Электронный pecypc http://www.paques.nl/en/about_paques/
- Условия 217. Абрамов Б. H. формирования рудоносность флюидно-И брекчий Шерловогорского эксплозивных олово-полиметаллического Забайкалье) (Восточное // Вестник Томского месторождения Государственного Университета. - 2011. - С. 195-198.
- 218. Кулагашев А. И. О магматогенных брекчиях Шерловой горы и связанной с ними рудной минерализации // Материалы III научной конференции ЗабНИИ. Чита.- 1968. - С. 60-71.