

Анциферов Дмитрий Викторович

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

Специальность 03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2018

Работа выполнена в лаборатории биохимии и молекулярной биологии Кафедры физиологии растений и биотехнологии Биологического института Томского государственного университета.

Научный руководитель: **Ольга Викторовна Карначук,**
доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой физиологии растений и биотехнологии Томского государственного университета

Официальные оппоненты: **Грабович Маргарита Юрьевна,**
доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии и физиологии клетки Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет»

Щербакова Виктория Артуровна,
кандидат биологических наук, заведующая лабораторией анаэробных микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г. К. Скребина» РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук

Защита состоится 27 февраля 2018 г. в 14⁰⁰ на заседании диссертационного совета Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского по адресу: 117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНМИ РАН (117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru/>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2018 года

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Хижняк Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Образование сульфидов металлов сульфатредуцирующими бактериями (СРБ) - известный биогеохимический процесс. В его основе лежит химизм диссимиляционной сульфатредукции. Конечный продукт восстановления сульфата, 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 pH. 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 кислых местообитаниях (обзор Koschorreck, 2008), выделение ацидофильных/ацидотолерантных СРБ до сих пор не имело большого успеха. К настоящему времени в литературе описаны единичные 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-металл-окисляющих прокариот (Orell et al., 2010, 2012; 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 характеристика твердой фазы является определяющим фактором при целенаправленном получении наноразмерных и наноструктурированных сульфидов металлов. В частности, сульфид меди Cu_2S является важным полупроводником p-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 (Co_9S_8) - 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 кристаллических и наноструктурированных сульфидов металлов. Для выделения устойчивых форм СРБ могут быть использованы новые подходы, направленные на преодоление ограничений традиционных методов культивирования. Культивирование в биореакторе позволяет контролировать доминирование ацидофильных форм путем изменения параметров среды, и может быть использовано для накопления и выделения ацидофильных/ацидотолерантных СРБ. Непрерывное культивирование 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**:

1. 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 выделения чистых культур ацидофильных/ацидотолерантных представителей рода *Desulfovibrio*.
3. 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.
5. Изучить возможность образования кристаллических сульфидов меди и кобальта при непрерывном культивировании ацидофильных СРБ в биореакторе.

Научная новизна работы. Выделены новые ацидофильные и ацидотолерантные СРБ, относящихся к родам *Desulfovibrio* (Deltaproteobacteria) и *Desulfosporosinus* (Firmicutes). Чистые культуры ацидотолерантных *Desulfovibrio* были выделены с использованием нового подхода, основанного на создании

временного градиента pH в биореакторе, совмещенного с молекулярным мониторингом изменений в сообществе микроорганизмов. Впервые ацидофильный представитель рода *Desulfosporosinus* был успешно культивирован в непрерывном режиме путем создания бинарной культуры с ацидотолерантным *Desulfovibrio*. Впервые показана биоминерализация микро- и макрокристаллов сульфидов кобальта чистыми культурами микроорганизмов. Впервые продемонстрирована возможность образования биогенных ярровита (Cu_9S_8) и линнеита (Co_3S_4) 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 металлы. Данные по культивированию штаммов-продуцентов 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 штаммов СРБ, 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 Томского государственного университета. Эксперименты по изучению устойчивости СРБ к кислороду и механизмов защиты выполнены автором совместно с д-ром Гелем Брассьером.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на 11-м международном конгрессе «Extremophiles-2016» (Киото, Япония, 2016 г.), X 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.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 4 экспериментальные статьи в международных рецензируемых журналах.

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

Сокращения. СРБ – сульфатредуцирующие бактерии; TEM – трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия; SEM – сканирующая электронная микроскопия; ICP-MS – масспектральный анализ с индуктивно связанной плазмой; XRD – рентгенофазовый анализ; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ДГГЭ – денатурирующий гель электрофорез; NADH – восстановленный никотинамидадениндинуклеотид; ОБП – окислительно-восстановительный потенциал; АТФ – аденозинтрифосфат; ЭДС (EDS) – энергодисперсионный анализ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объекты исследования. Для выделения культур СРБ были использованы пробы воды и микробных обрастаний, отобранные в 2014 году из отходов Акатуйского месторождения полиметаллических руд и месторождения Шерловая гора в Забайкальском Крае. Из отобранных проб были получены накопительные культуры и выделены новые изоляты СРБ. Также были использованы чистые культуры ацидофильных/ацидотолерантных СРБ из коллекции Лаборатории биохимии и молекулярной биологии при Кафедре физиологии растений и биотехнологии Томского государственного университета. При проведении исследований по устойчивости к кислороду в качестве референсной культуры использовали штамм *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, который был любезно предоставлен сотрудниками Лаборатории химии бактерий Национального Исследовательского Центра Франции (Марсель, Франция).

Отбор проб и полевые исследования. Образцы воды и матов, предназначенные для культивирования, отбирали в стерильные флаконы объемом 50 мл. Во время отбора проб измеряли температуру, кислотность и окислительно-восстановительный потенциал воды и осадка. Для измерения использовали портативный рН-метр HANNA HI 8314F. Образцы воды для химического анализа фильтровали через стерилизующий фильтр-насадку Millipore

Выделение и культивирование СРБ в периодической культуре. Накопительные и чистые культуры СРБ выращивали анаэробно в жидкой пресноводной среде Видделя (Widdel and Bak, 1992) с сульфатом в качестве акцептора электронов при 28 °С. Лактат (6 мМ) и фруктозу (5 мМ) использовали как источники углерода и доноры электронов. Чистые культуры выделяли методом предельных разведений или изолируя отдельно лежащие колонии из столбика агаризованной среды. Для изучения устойчивости полученных штаммов СРБ к металлам их культивировали в анаэробных условиях в присутствии металлов по разработанной ранее методике (Karnachuk et al., 2008). При определении предельных и оптимальных значений рН для роста штаммов использовали 1М растворы H_2SO_4 и NaHCO_3 , при этом из среды Видделя удаляли карбонатный буфер. Удельную скорость роста рассчитывали по приросту биомассы, эксперименты проводили в трех биологических повторностях.

Культивирование в биореакторе. Для проведения экспериментов использовали биореактор Sartorius Biostat В plus. Для создания анаэробных условий среду продували азотом высокой степени очистки (99.98%). Культивировали в полунепрерывном и непрерывном (проточном) режиме со скоростью замены среды 13 мл/час при 28 °С.

Микроскопия. Микрофотосъемку и элементный анализ осадков проводили с использованием сканирующего электронного микроскопа Philips SEM 515

(Philips Export BV, Нидерланды), оборудованного микрозондом для элементного анализа, как описано Ikkert et al. (2013), и с использованием 3D-сканирующего электронного микроскопа Quanta 200 (FEI Company, США) с интегрированной системой для энергодисперсионного анализа. Ультраструктуру бактериальных клеток изучали методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) на электронном микроскопе JEM-100 CXII (JEOL, Япония) при 80 кВ. Срезы и микрокопирование проводили по разработанной в нашей лаборатории методике (Ikkert et al., 2013). Распределение элементов в бактериальных клетках исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 (JEOL), оснащенного детектором для элементного картирования X-Max EDS (Oxford Instruments, Великобритания). Живые клетки СРБ наблюдали с использованием фазово-контрастной микроскопии на микроскопе 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.

Аналитические методы. Концентрацию сероводорода в культуральной жидкости определяли спектрофотометрически с N,N-диметилпарафенилдиамином (Cline, 1969). Концентрацию белка в культуральной жидкости определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951). Спектральный анализ с целью определения цитохромов проводили на спектрофотометре SLM Aminco™ DW-2000 UV-VIS в диапазоне длин волн 350 нм – 750 нм. Восстановление кислорода штаммами СРБ исследовали с помощью миллиамперметра Gilson medical electronics, при контроле pH и температуры. Для проверки устойчивости к окислительному стрессу культуры СРБ культивировали в пробирках Хангейта в оптимальных условиях. Питательную среду продували смесью газов, приготовленной с помощью смесителя газов PEGAS 4000 MF. Концентрацию растворенного кислорода измеряли с помощью регистратора Mettler-Toledo M700, оснащенного модулем O₂ ppb 4700 и полярографическим сенсором растворенного кислорода InPro 6900. Оптическую плотность измеряли с помощью лабораторного цифрового колориметра Biochrom WPA CO7000 при длине волны 600 нм. Количественное содержание элементов в пробах шахтных отходов и в культуральной жидкости определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS) и ионной хроматографии. Состав кристаллических фаз в осадках, полученных в результате культивирования СРБ в присутствии металлов, исследовали с помощью дифрактометра Shimadzu XRD 6000 с рентгенофазовым анализом. Данные обрабатывали в программном обеспечении Crystallographica-Search Match с использованием базы данных PDF-4 (International Center Diffraction Data, <http://www.icdd.com>).

Молекулярные методы. Тотальную ДНК из культур СРБ выделяли с использованием набора MO BIO Power Soil DNA Kit (MO BIO Laboratories, Inc., США) в соответствии с рекомендациями производителя. Амплификацию гена 16S рРНК проводили с праймерами 27F-1492R и v3f-907r, как было описано ранее

(Karnachuk et al., 2009). Реакцию проводили в амплификаторе MyCycler (BioRad). Для контроля доминирующих фило типов в накопительных культурах и для проверки чистоты полученных изолятов СРБ применяли денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ПЦР-ДГГЭ). Процесс разделения ДНК проводили на системе DCode System (BioRad laboratories, Hercules, США). Реамплифицированные последовательности были секвенированы в ЗАО «Синтол», Москва. Последовательности анализировали с использованием программного пакета BioEdit и инструмента BLAST GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul et al., 1997). Филогенетические анализы проводили с использованием программного обеспечения ARB (Ludwig et al., 2004). Чтобы определить порядок ветвления, бутстреп-анализ был выполнен с использованием 1000 альтернативных деревьев.

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

Результаты работы и их обсуждение

Физико-химическая характеристика проб отходов добычи металлов. Физико-химические характеристики проб воды и матов представлены в таблице 1. Присутствие растворенных сульфатов в пробах свидетельствуют о развитых процессах окисления сульфидных минералов, генерирующих протоны. Несмотря на развитые процессы окисления, pH воды в пробе ShG14-5 был близким к нейтральному, что связано с присутствием карбонатов во вмещающих породах, нейтрализующих протоны, образующиеся при окислении сульфидов (Banks et al., 2014). Вероятно, более развитые процессы окисления в осадках ShG14-4 ответственны за слабокислый pH, в то время как pH воды из шурфа на месторождении Шерловая гора составлял 2.58. Активное окисление остаточных сульфидов и низкий pH являются причиной высоких концентраций металлов в воде пробы ShG14-1.

Получение накопительных и выделение чистых культур кислотолюбивых СРБ. Из всех трех отобранных проб были получены накопительные культуры с признаками сульфидогенеза, которые обозначили в соответствии с названием проб: ShG-14-1, ShG-14-4 и ShG-14-5. Определение доминирующих фило типов методом ПЦР-ДГГЭ показало присутствие *Desulfosporosinus* и *Desulfovibrio* в сульфидогенных накопительных культурах (таблица 2).

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, обозначенный «штамм NP». Штамм NP представлен подвижными, слегка изогнутыми палочками с округлыми концами, размером 2.5-4 x 1 мкм, образующими паратерминальные споры (рис. 1А, Б).

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

Название пробы	ShG-14-1	ShG -14-4	ShG -14-5
Координаты мест отбора проб	50°33'22.2"N 116°16'55.8"E	51°03'51.1"N 117°46'36.1"E	51°04'01.6"N 117°46'17.2"E
Дата отбора проб	27.07.2014	29.07.2014	29.07.2014
T, °C	6.6	9.7	2.8
pH воды	2.58	6.7	7.15
Eh воды, mV	+494	+258	+271
[SO ₄ ²⁻], мг/л	15990	400	223
Fe, мг/л	1898	0.078	0.141
Cu, мг/л	80.9	0.0011	0.0006
As, мг/л	48.1	0.06	0.053
Cd, мг/л	16.0	0.002	0.004
Co, мг/л	2.60	0.0001	0.0008
Ni, мг/л	3.47	0.0014	0.0072

Таблица 2. Доминирующие филоциты, выявленные в полученных накопительных культурах методом ПЦР-ДГТЭ

Название накопительной культуры	pH	Субстрат	Доминирующие филоциты определенные методом ПЦР-ДГТЭ*
ShG-14-1	2.5	Фруктоза	<i>Bacteroides dorei</i> , 100 <i>Desulfosporosinus meridiei</i>, 99 ** <i>Desulfurispora thermophila</i>, 91
ShG-14-4	5.2	Этанол	<i>Clostridium beijerinckii</i> , 99 <i>Desulfovibrio mexicanus</i>, 98
ShG-14-5	5.5	Лактат	<i>Paludibacter propionigenes</i> , 97 <i>Desulfovibrio mexicanus</i>, 98-99

*ближайший валидно описанный родственник, % сходства частичной последовательности (595 п.о.) гена 16S рНК.

**Полужирным шрифтом выделены организмы с известной способностью к диссимиляционной сульфатредукции.

Филогенетический анализ последовательности гена 16S рНК, близкой к полной (1446 п.о.), поместил штамм NP в семейство Peptococcaceae, род *Desulfosporosinus* (рис. 2). Последовательность имела сходство 97 % с четырьмя валидно описанными видами рода *Desulfosporosinus* – *Desulfosporosinus meridiei*, *Desulfosporosinus orientis*, *Desulfosporosinus auripigmenti* и *Desulfosporosinus acidiphilus*.

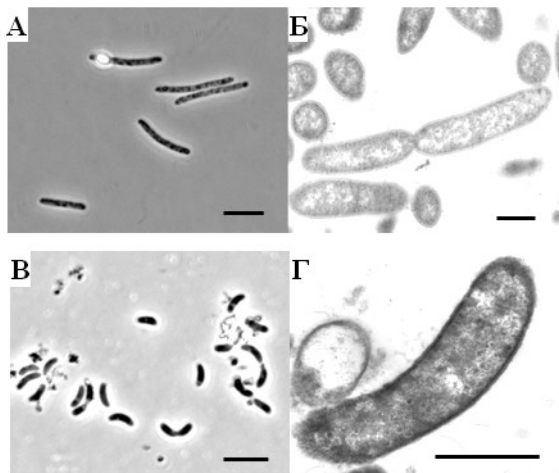


Рис. 1. Микрофотографии *Desulfosporosinus* sp. NP, фазовый контраст, линейка 5 мкм (А), ТЕМ, ультратонкий срез, линейка 1 мкм (Б) и *Desulfovibrio* sp. DV, фазовый контраст, линейка 5 мкм (В) и ТЕМ, ультратонкий срез, линейка 1 мкм (Г).

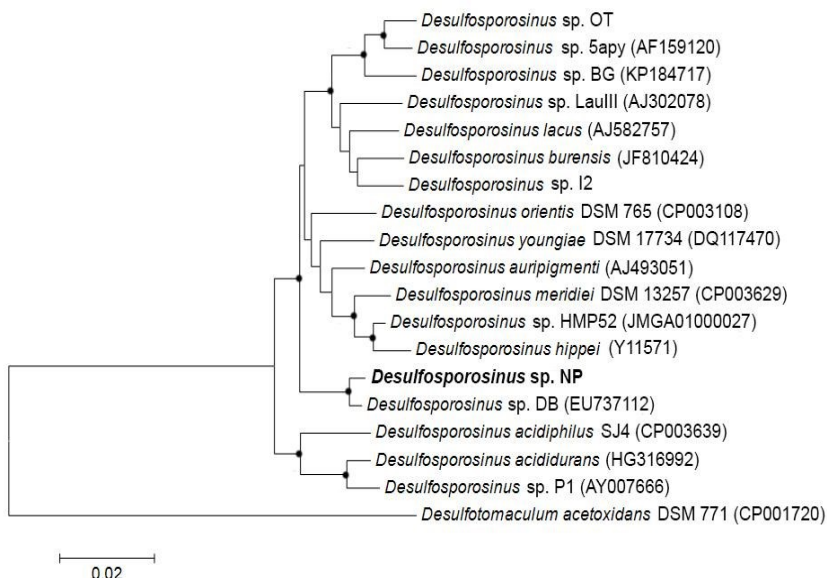


Рис. 2. Филогенетическое дерево по гену 16S рРНК, построенное методом ближайшего соседа (neighbor-joining) и показывающее положение штамма *Desulfosporosinus* sp. NP. Узлы дерева, обозначенные кружками, характеризуются значениями бутстреппинга выше 70 %.

Накопительная культура ShG-14-4 была получена на среде с этанолом при pH 5.0. ПЦР-ДГГЭ анализ определил один доминирующий СРБ-филотип, родственный *Desulfovibrio mexicanus* (Таблица 2). Из накопительной культуры ShG-14-4 был получен чистый изолят путем посева на твёрдую среду с последующим выделением колоний. Полученная морфологически однородная культура была обозначена «штамм DV». Изолят представлен подвижными вибрионами, размером 2.5-3 x 1 мкм (рис. 1 В, Г). Филогенетический анализ близкой к полной последовательности гена 16S рНК (1428 п.о.) показал, что штамм DV относится к классу Deltaproteobacteria, семейству Desulfovibrionaceae, роду *Desulfovibrio*, а его ближайшим родственником является *Desulfovibrio magneticus* RS-1 со сходством последовательностей 98.5% (рис. 6).

Получение чистых культур путем создания градиента pH биореакторе.

В качестве инокулята для биореактора использовали накопительную культуру ShG-14-5. В биореакторе создавали градиент pH от нейтрального к кислому (рис. 3), что приводило к доминированию определенных филотипов. Отбор проб из биореактора, сопровождаемый серией разведений на среде с кислым pH, позволил выделить доминирующие организмы в чистой культуре. Параллельно проводили определение доминирующих филотипов методом ПЦР-ДГГЭ (рис. 4).

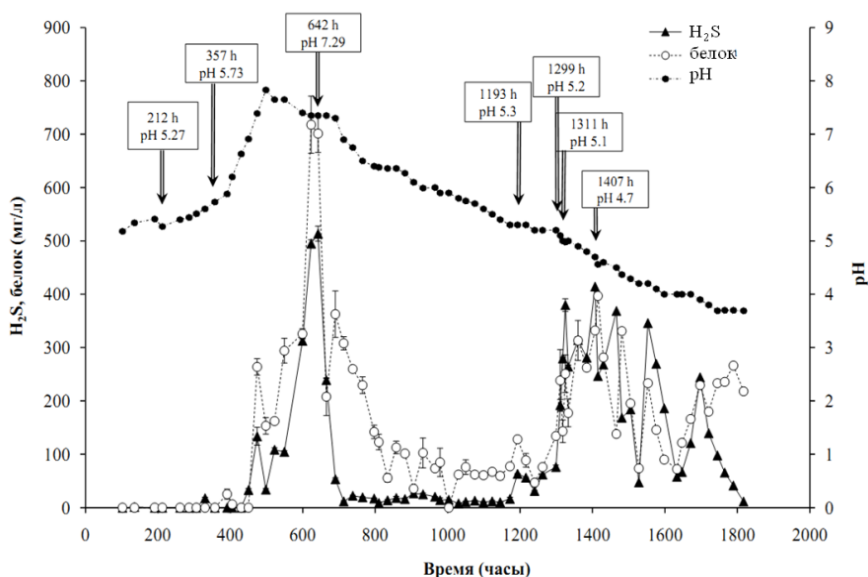


Рис. 3. Изменение pH, концентрации белка и H₂S в биореакторе в процессе культивирования. Точки отбора проб и соответствующие значения pH показаны стрелками. Вертикальные линии показывают стандартное отклонение (n=3).

Все обнаруженные нами филоциты, для которых известна способность к сульфатредукции, относились к роду *Desulfovibrio*. СРБ-филоциты относились к двум группам: *Desulfovibrio aerotolerans* – *Desulfovibrio carbinophilus* – *Desulfovibrio magneticus* и *Desulfovibrio idahonensis* – *Desulfovibrio mexicanus* (рис. 4).

Чистая культура, обозначенная «штамм ВК», была представлена подвижными вибрионами, размером 2.5-3 x 1 мкм (рис. 5 А, Б). Филогенетический анализ последовательности гена 16S рНК штамма ВК (1427 п.о.), поместил изолят в класс Deltaproteobacteria, семейство Desulfovibrionaceae, род *Desulfovibrio*. Ближайший родственник штамма ВК - *Desulfovibrio carbinophilus* со сходством последовательности гена 16S рНК 98.8% (рис. 6). *Desulfovibrio* sp. ВК относится к группе *Desulfovibrio aerotolerans* – *D. carbinophilus* – *D. magneticus*.

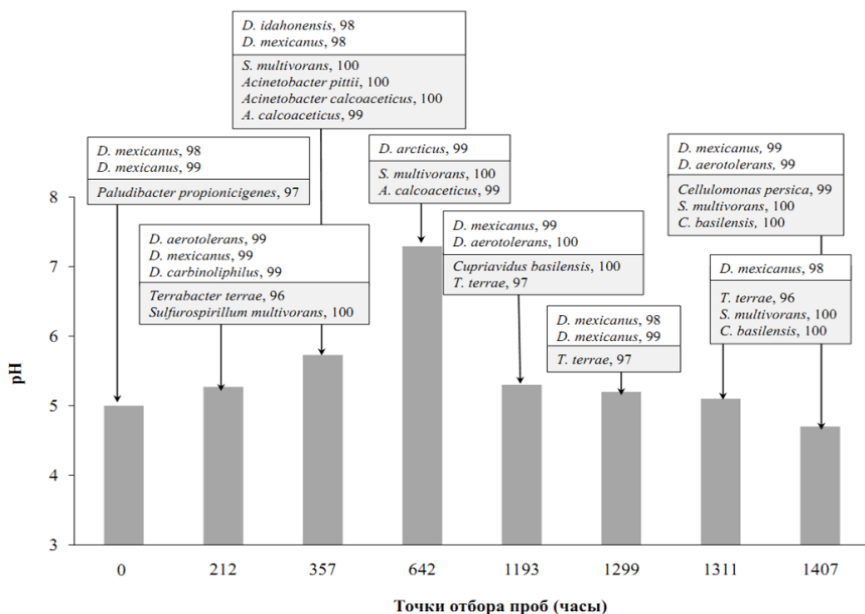


Рис. 4. Доминирующие филоциты бактерий в биореакторе и исходной накопительной культуре. Филоциты, для которых неизвестна способность к диссимиляционной сульфатредукции, выделены серым цветом. Цифрами показан процент сходства фрагмента гена 16S рНК с ближайшим валидно описанным представителем.

Чистая культура, обозначенная «штамм ED», представлена подвижными вибрионами, размером 1-1.5 x 0.3-0.5 мкм (рис. 5 В, Г). Филогенетический анализ последовательности гена 16S рНК (1438 п.о.) помещает изолят в класс Deltaproteobacteria, семейство Desulfovibrionaceae, род *Desulfovibrio*. Ближайшим родственником штамма ED является *Desulfovibrio idahonensis* с 99.6% сходства

последовательностей. *Desulfovibrio* sp. ED относится к группе *D. idahonensis* – *D. mexicanus* (рис. 6).

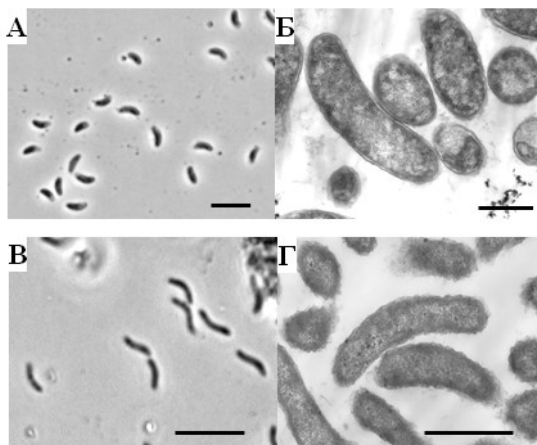


Рис. 5. Микрофотографии *Desulfovibrio* sp. VK, фазовый контраст, линейка 5 мкм (А), ТЕМ, ультратонкий срез, линейка 1 мкм (Б) и *Desulfovibrio* sp. ED, фазовый контраст, линейка 5 мкм (В) и ТЕМ, ультратонкий срез, линейка 1 мкм (Г).

Определение предельных и оптимальных значений pH. Все выделенные штаммы *Desulfosporosinus* и *Desulfovibrio* проявляли устойчивость к низким значениям pH среды. *Desulfosporosinus* sp. NP рос в интервале значений pH среды от 1.3 до 6.7. Максимальную численность клеток в среде наблюдали при pH 2.0 – 2.5. Определены удельные скорости роста штаммов *Desulfovibrio* на среде с разными значениями pH (рис. 7). Показано, что *Desulfovibrio* sp. DV способен к росту при pH среды от 4.0 до 7.0. Максимальная удельная скорость роста штамма DV, $0.035 \pm 0.002 \text{ ч}^{-1}$, обнаружена при pH 5.5. *Desulfovibrio* sp. ED рос при pH среды от 3.5 до 7.8. При оптимальном pH 6.6 его удельная скорость составляла $0.07 \pm 0.006 \text{ ч}^{-1}$ с минимальным временем удвоения $9.9 \pm 0.8 \text{ ч}$. *Desulfovibrio* sp. VK характеризовался более широким диапазоном pH для роста - от 2.8 до 7.8. Оптимальное значение pH составило 5.7.

Потребление кислорода и механизмы защиты. Так как штаммы *Desulfovibrio* были выделены из окисленных шахтных отходов, характеризующихся положительными значениями ОВП, мы предположили наличие у них механизмов устойчивости к кислороду. В качестве референсного организма использовали *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, имеющего защитные механизмы от токсического действия O_2 (Lamrabet et al., 2011). Штаммы *Desulfovibrio* sp. DV, *Desulfovibrio* sp. VK и *Desulfovibrio* sp. ED не проявляли

устойчивости к кислороду в концентрации 0.01%, тогда как *D. vulgaris* Hildenborough рос в данных условиях.

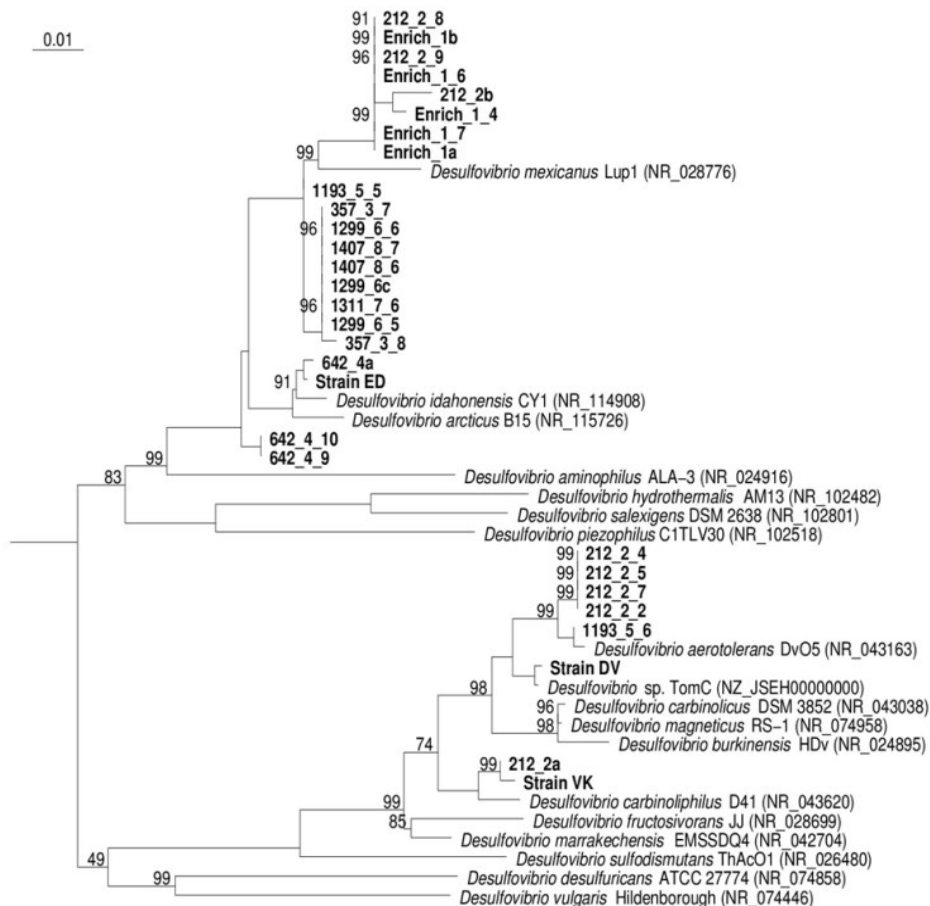


Рис. 6. Филогенетическое дерево по гену 16S рРНК, построенное методом ближайшего соседа (neighbor-joining) и показывающее положение штаммов ED, VK, DV и фило типов *Desulfovibrio*, определенных методом ПЦР-ДТГЭ.

На спектрах поглощения клеток всех исследованных штаммов *Desulfovibrio* обнаружены пики, характерные для гемов цитохромоксидаз с- и d-типов (рис. 8). Это предполагает присутствие в клетках цитохромоксидаз типа с и bd, которые играют важную роль в защите анаэробных микроорганизмов от окислительного стресса в присутствии кислорода (Lamrabet et al., 2011). Количественное содержание цитохрома bd в клетках новых штаммов *Desulfovibrio* (0.23 – 0.24 нмоль/мг) было почти вдвое выше, чем у *D. vulgaris* Hildenborough. Можно

предполагать, что клетки исследуемых штаммов *Desulfovibrio* используют защитный механизм, обеспечиваемый цитохромом bd, тогда как в защите *D. vulgaris* Hildenborough участвует преимущественно цитохром с.

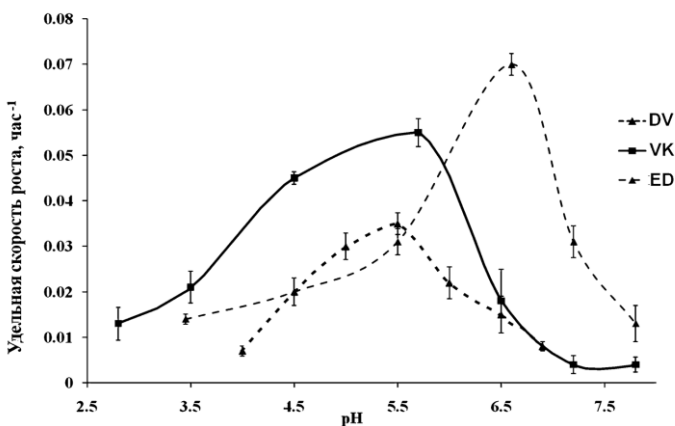


Рис. 7. Изменение удельной скорости роста *Desulfovibrio* sp. VK, *Desulfovibrio* sp. ED и *Desulfovibrio* sp. DV в зависимости от pH среды. Вертикальные линии показывают стандартное отклонение (n=3).

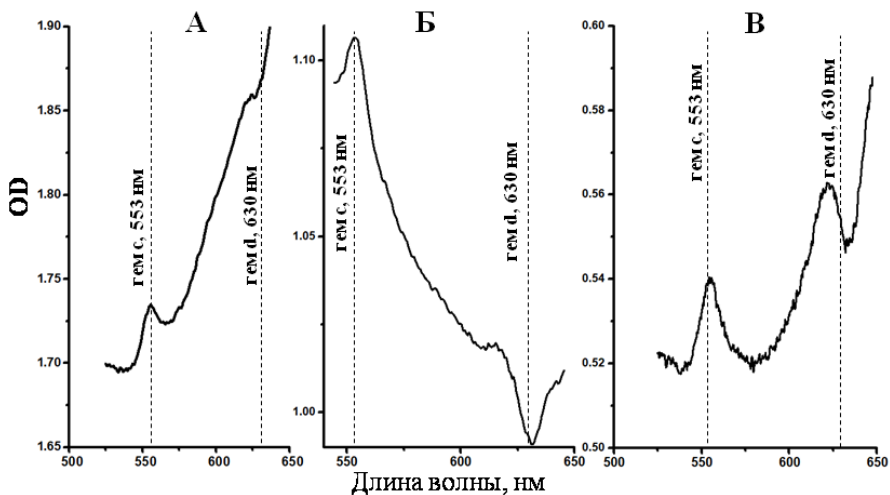


Рис. 8. Спектры поглощения клеток *Desulfovibrio* sp. DV (А), *Desulfovibrio* sp. VK (Б), *Desulfovibrio* sp. ED (В) в диапазоне длин волн 500 – 650 нм.

Восстановление кислорода с использованием молекулярного водорода в качестве донора электронов, известное для *D. vulgaris* Hildenborough (Ramel et al., 2013), не было подтверждено для наших штаммов, как и способность использовать NADH с этой целью. Однако штаммы DV, ED и VK восстанавливали кислород, используя лактат в качестве донора электронов. Для штамма ED также показано восстановление кислорода в присутствии других органических доноров электронов: этанола, пептона и глицерола. Восстановление кислорода ингибировалось во всех случаях при добавлении KCN.

Анализ генома *Desulfovibrio* sp. DV. Характеристики генома штамма *Desulfovibrio* sp. DV представлены в таблице 3.

Таблица 3. Характеристика генома *Desulfovibrio* sp. DV

Параметр	
Размер геном, млн. нт	4.9 млн. нт.
Количество белок-кодирующих генов	4350
GC состав, %	62.95
Гены tРНК	48
Количество рибосомных оперонов	4

Одной из наиболее важных систем, участвующих в генерации внутреннего положительного потенциала на мембране клетки и защите клетки от низких pH, является Kdp-АТРаза. Гомологичная Kdp-АТРаза была найдена в геноме *Desulfovibrio* sp. DV. Оперон содержал регулятор транскрипции – двухкомпонентную гистидин киназу. Несколько дополнительных регулирующих гистидин киназ KdpD также присутствовало в геноме. Также в поддержании pH цитоплазмы клетки может принимать участие Na⁺/протон антипортер. Гомологичные транспортеры обнаружены только в единичных представителях рода *Desulfovibrio*. Бактерии, обитающие в кислых местообитаниях, могут использовать декарбоксилазы, потребляющие протоны, такие как аргинин декарбоксилаза. Они также найдены в геноме *Desulfovibrio* sp. DV. Лизин декарбоксилаза присутствовала только у членов кластера “magneticus” и отсутствовала у всех остальных *Desulfovibrio*. Очевидно также участие в повышении внутриклеточного pH аргинин декарбоксилазой.

Штамм *Desulfovibrio* sp. DV был чувствителен к меди, однако мог расти при 1.7 г Со(II) на литр. Поиск в геноме показал, что три штамма из кластера “magneticus” имели одинаковые возможные транспортеры кобальта. В *Desulfovibrio* sp. DV это CoгA_ZntB семейство транспортеров, известных для *E. coli* и *Salmonella typhimurium*. Этот белок присутствовал кроме штамма DV только в *Desulfovibrio magneticus* и *Desulfovibrio* sp. TomC. Также в геноме *Desulfovibrio* sp. DV присутствовали RND-транспортеры Czc, участвующие в защите от ионов кобальта, цинка и кадмия.

Устойчивость к металлам. Предельные концентрации Ni(II), Co(II), Cu(II) и Cd(II), позволяющие рост, были определены для всех штаммов (таблица 4). Наибольшая устойчивость к кобальту (II) была зафиксирована для штамма *Desulfovibrio* sp. VK. Присутствие металлов в среде способствовало удлинению лаг-фазы всех исследуемых штаммов.

Таблица 4. Предельные концентрации металлов, позволяющие рост штаммов СРБ, определенные при оптимальных значениях pH

Штамм	Предельные концентрации металлов, позволяющие рост, мг/л			
	Cu(II)	Cd(II)	Ni(II)	Co(II)
<i>Desulfovibrio</i> sp. DV	325	50	175	1650
<i>Desulfovibrio</i> sp. VK	275	60	250	3500
<i>Desulfovibrio</i> sp. ED	100	70	150	2000
<i>Desulfosporosinus</i> sp. NP	200	100	200	225

Образование сульфидов Co(II) при периодическом культивировании. Кристаллические сульфиды кобальта, джайпурит (CoS) и кобальтпентландит (Co₉S₈), были получены при культивировании *Desulfosporosinus* sp. NP, *Desulfovibrio* sp. VK, *Desulfovibrio* sp. ED и *Desulfovibrio* sp. DV (рис. 9). В химических контролях без клеток сульфиды кобальта отсутствовали, что свидетельствует о важной роли клеточных структур при нуклеации кристаллов. Элементные карты на ультратонких срезах клеток подтвердили обогащение клеточной стенки бактерий S и Co.

Культивирование СРБ в непрерывном режиме. Попытки культивирования ацидофильных штаммов из коллекции лаборатории, *Desulfosporosinus* sp. I2 и *Desulfosporosinus* sp. BG, в режиме pH-стата в биореакторе не дали положительных результатов. 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.

Попытки выращивания чистой культуры *Desulfosporosinus* sp. NP в протоке, как в режиме pH-стата, так и в отсутствие контроля pH, не были успешными. Проблема введения ацидофильных *Desulfosporosinus* sp. NP была решена путем создания бинарной культуры, состоящей из *Desulfosporosinus* sp. NP и *Desulfovibrio* sp. VK. Культура была успешно культивирована в биореакторе с использованием смеси субстратов (3 мМ лактат + 2.5 мМ фруктоза) при начальном pH 4.5. Существенные различия в морфологии культур позволили учитывать численность клеток двух штаммов без применения молекулярных зондов. На поздних этапах культивирования (после 756 часов) путем создания селективных условий по питательному субстрату (5 мМ фруктоза) удалось добиться стабильного доминирования клеток *Desulfosporosinus*. Далее культивирование продолжили при

pH 5.4 с постоянной скоростью подачи среды 13 мл/ч для исследования осаждения металлов и образования сульфидов.

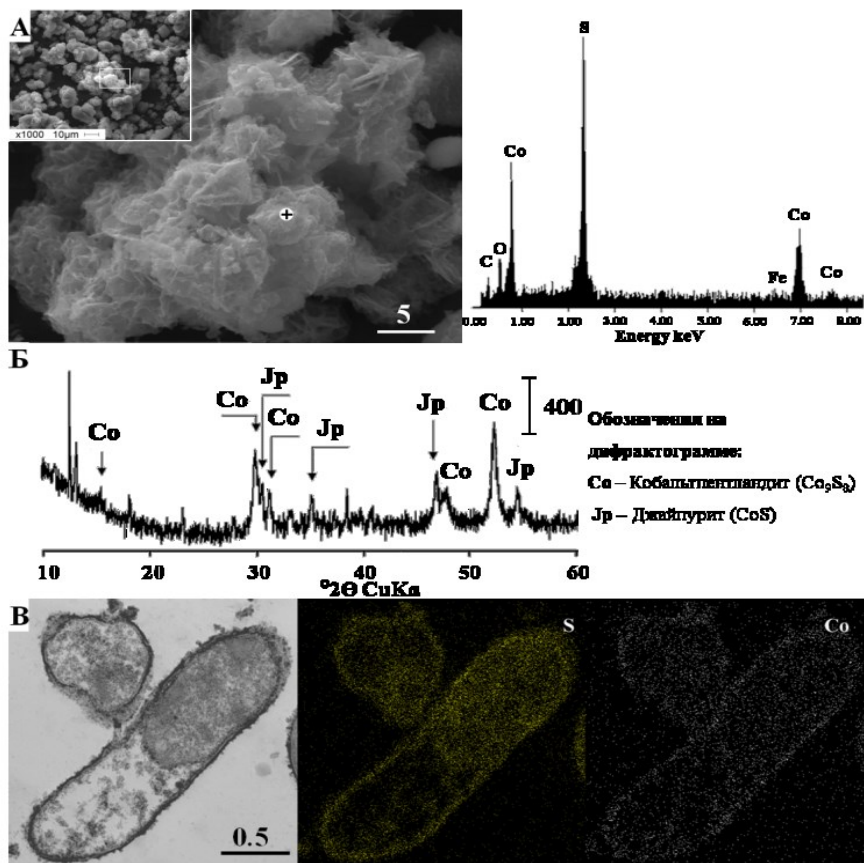


Рис. 9. Образование кристаллических сульфидов кобальта *Desulfovibrio* sp. DV в периодической культуре на среде с лактатом в присутствии 1000 мг/л Co(II) в течение 28 суток: (А) SEM осадка и соответствующий ЭДС-спектр; (Б) XRD анализ кристаллических фаз (В) ТЕМ ультратонких срезов клеток и элементарные карты, показывающие связь S и Co с клеточной стенкой. Размер линейки в мкм.

Получение сульфидов Co(II) и Cu(II) в биореакторе с проточным режимом культивирования. Для изучения осаждения металлов под действием бинарной культуры СРБ, начиная с точки 1761 час, в биореактор начали подавать питательную среду с ионами меди (II) в концентрации 50 мг/л (рис. 10 А). Начальную концентрацию ионов меди постепенно повышали до 100, 150 и 200

мг/л, при этом концентрация металла в пробах культуральной жидкости из биореактора находилась в диапазоне 0.4 – 4.5 мг/л. Таким образом, осаждение меди составило более 95%. После 3156 часов культивирования по той же схеме в среду добавляли ионы кобальта (II) (рис. 10 Б). Увеличение концентрации ионов Co(II) в протоке до 200 мг/л вызвало лизис клеток (рис. 10 Б).

Осадки, образованные бинарной культурой в протоке в присутствии ионов меди и кобальта, были собраны в нескольких временных точках для проведения физико-химического анализа. SEM-EDS анализ показал присутствие меди, серы и железа во всех исследованных осадках. Образование кристаллических сульфидов меди – халькопирита (CuFeS_2), кубанита (CuFe_2S_3), орикита ($(\text{CuFeS}_2)\text{xH}_2\text{O}$) наблюдали после 265 часов от начала подачи питательной среды, содержащей медь в концентрации 50 мг/л (2026 часов от начала культивирования) (таблица 5). Повышение концентрации меди в питательной среде приводило к образованию сульфидов меди, дефицитных по железу, ярровита (Cu_9S_8) и халькоцита (Cu_2S) (таблица 5). При увеличении концентрации Cu(II) в подаваемой среде до 200 мг/л происходила смена кристаллических фаз, и формировались другие кристаллические сульфиды меди - халькопирит (CuFeS_2) и ковеллит (CuS) (таблица 5). Вероятно, концентрация Cu(II) в среде служит фактором, определяющим кристаллическую форму образуемых сульфидов.

Через 3150 часов от начала культивирования в биореакторе ионы меди в подаваемой питательной среде были заменены на Co(II) . Рентгенофазовый анализ осадков, образованных культурой в условиях подачи Co(II) , показал отсутствие кристаллических сульфидов кобальта после 120 часов культивирования. Единственными кристаллическими сульфидами были сульфиды меди, ковеллит (CuS) и халькопирит (CuFeS_2), и сульфид железа, марказит (FeS_2) (таблица 5). Кристаллическую фазу, соответствующую сульфиду кобальта, линнеиту (Co_3S_4), обнаружили только через 292 часа после начала подачи питательной среды, содержащей Co(II) (3448 часов после начала культивирования) (таблица 5). В составе осадка, собранного в точке 3448 часов, также присутствовали кристаллические сульфиды железа и меди, пирротин (Fe_7S_8), халькопирит (CuFeS_2) и халькоцит (Cu_2S) (таблица 5).

В сульфидных отложениях, обнаруженных на внутренних поверхностях биореактора после завершения эксперимента, рентгенофазовый анализ выявил кристаллические фазы халькопирита (CuFeS_2), джайпурита (CoS) и гидрата сульфита кобальта ($\text{CoSO}_3 \times 2.5\text{H}_2\text{O}$).

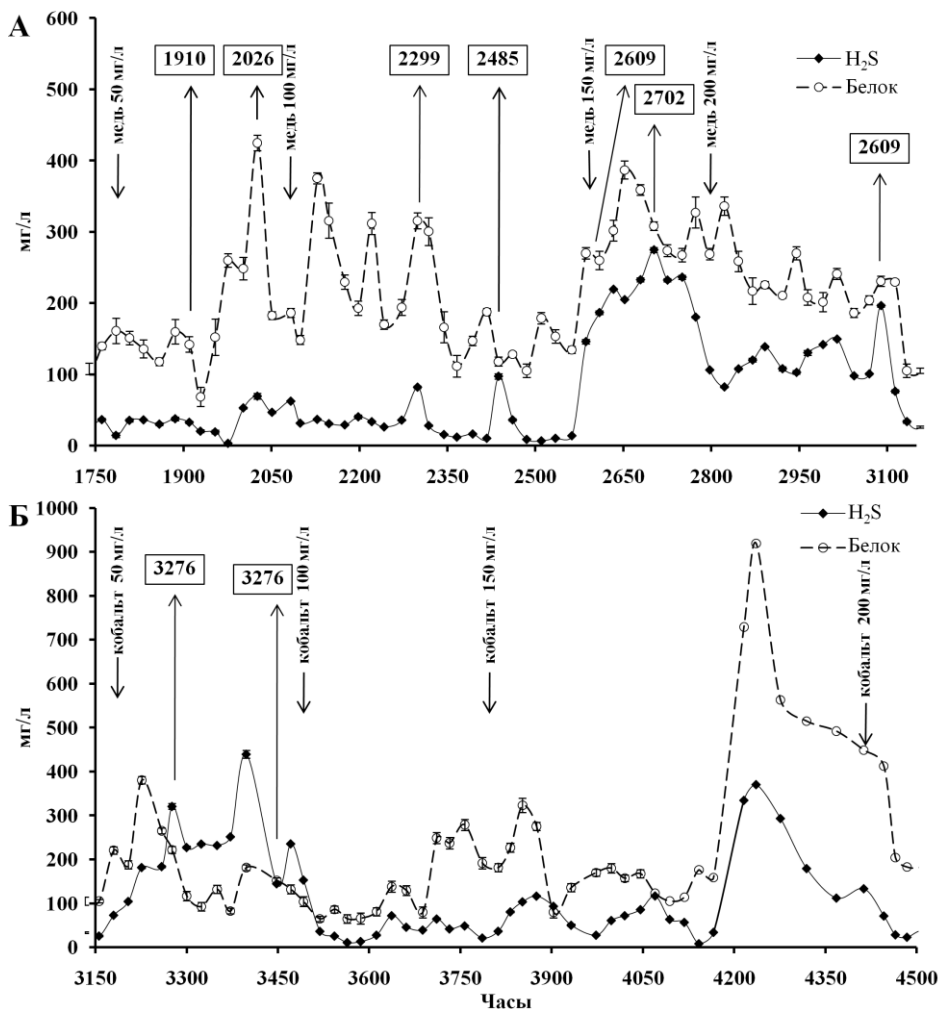


Рис. 10. Изменение концентрации белка и сероводорода и изменение pH при культивировании бинарной культуры *Desulfosporosinus* sp. NP и *Desulfovibrio* sp. VK в биореакторе с добавлением ионов меди (II) (А) и ионов кобальта (II) (Б). Показаны исходные концентрации металлов в питательной среде и временные точки (часы), в которых определяли кристаллические фазы (n=3).

Таблица 5. Кристаллические фазы, образованные в биореакторе при непрерывном культивировании бинарной культуры *Desulfosporosinus* sp. NP и *Desulfovibrio* sp. VK, в присутствии ионов меди и кобальта

Время культивирования, часы	Концентрация металла в подаваемой среде, мг/л	Кристаллические фазы, определенные методом XRD
1910	Cu(II), 50	галлит (NaCl) пирит (FeS ₂)
2026	Cu(II), 50	кубанит (CuFe ₂ S ₃) орикит ((CuFeS ₂)xH ₂ O) халькопирит (CuFeS ₂)
2299	Cu(II), 100	галлит (NaCl) ярровит (Cu ₉ S ₈) халькоцит (Cu ₂ S)
2485	Cu(II), 100	галлит (NaCl) ярровит (Cu ₉ S ₈) халькоцит (Cu ₂ S)
2609	Cu(II), 150	ярровит (Cu ₉ S ₈)
2702	Cu(II), 150	ярровит (Cu ₉ S ₈)
3089	Cu(II), 200	ковеллит (CuS) халькопирит (CuFeS ₂)
3276	Co(II), 50	галлит (NaCl) ковеллит (CuS) халькопирит (CuFeS ₂) сульфат меди (CuSO ₄) марказит (FeS ₂)
3448	Co(II), 50	линнаит (Co ₃ S ₄) пирротин (Fe ₇ S ₈) халькопирит (CuFeS ₂) халькоцит (Cu ₂ S)

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 от окислительного стресса. 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 O₂. 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 разработанный 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 достигала 95%. Для биоминерализации Co, 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 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 ATPаза) и натрия (Na^+ /протон антипортёр), которые могут обеспечивать устойчивость к низким pH, а также потребляющие протоны декарбоксилазы аминокислот. Устойчивость к Co(II) могут обеспечивать транспортеры CoxA-ZntB и RND-транспортер Czc.
4. При непрерывном культивировании в биореакторе *Desulfosporosinus* sp. NP и *Desulfovibrio* sp. VK получены кристаллические сульфиды меди: ярровит (Cu_8S_8), халькоцит (Cu_2S) и ковеллит (CuS), достигнуто осаждение меди из среды до 95%.
5. Показана способность к образованию макро- и микрокристаллов сульфида кобальта, джайпурита (CoS) и кобальтпентландита (Co_9S_8), чистыми культурами *Desulfosporosinus* sp. NP, *Desulfovibrio* sp. ED, *Desulfovibrio* sp. DV и *Desulfovibrio* sp. VK при периодическом культивировании.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Экспериментальные статьи

1. **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.
2. 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.
3. 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. fwl111.
4. 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.

Тезисы конференций

1. 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., Ковалева А.А., Ивасенко Д.А., Карначук О.В. Выделение ацидотолерантных *Desulfovibrio* с помощью культивирования в биореакторе. Материалы X молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной 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.
4. 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. Acta Naturae. Т. 2. С. 239.
5. Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Frank Y.A., **Antsiferov D.V.**, Karnachuk O.V., Ravin N.V. Desulfurudis 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.