

## БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 579.66

О.П. Буторова<sup>1</sup>, А.В. Козлова<sup>2</sup>, А.Л. Герасимчук<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Биологический институт Томского государственного университета (г. Томск)

<sup>2</sup> Материаловедческий центр Томского государственного университета (г. Томск)

### ОБРАЗОВАНИЕ СУЛЬФИДОВ МЕДИ *DESULFOVIBRIO SP. R2* В ОПТИМАЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ УСЛОВИЯХ

Работа выполнена при финансовой поддержке  
Министерства образования и науки РФ (программа «Кадры»;  
госконтракты № П1052 от 20 августа 2009 г. и № 6362р/8761 от 10 декабря 2008 г.).

*Определена оптимальная температура роста и образования сероводорода сульфатредуцирующими дельтапротеобактериями *Desulfovibrio sp. R2*, устойчивыми к повышенным концентрациям меди в среде и перспективными для использования в биотехнологиях осаждения металлов. Методом энергодисперсионного анализа показано образование бактериями *Desulfovibrio sp. R2* сульфида меди, соответствующего минералу ковеллиту, при оптимальной температуре 28°C.*

**Ключевые слова:** сульфатредуцирующие бактерии; *Desulfovibrio*; сульфиды меди; энергодисперсионный анализ; сканирующая электронная микроскопия.

Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) играют важную роль в осаждении сульфидов металлов в природных экосистемах и технологических схемах [1]. Образование сульфидов металлов – основной механизм, посредством которого СРБ осаждают тяжелые металлы из раствора [2]. Растворимость сульфидов двухвалентных металлов низкая и изменяется в пределах  $10^{-4}$ – $10^{-6}$  г/100 мл растворителя. Микробное осаждение металлов было продемонстрировано еще в середине прошлого века [3]. Образование ковеллита, сульфида меди, под действием биогенного сероводорода впервые показано Баас-Бекингом и Муром (Baas-Becking and Moore) в 1961 г. [4]. Мак-Нил (McNeil) с соавт. (1991) определил ковеллит и халькоцит ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) как основную твердую фазу сульфидов меди, образующихся биогенным путем [5]. Показано образование ковеллита накопительными культурами, содержащими СРБ [6]. Однако при попытке исследовать образование сульфидов металлов чистыми культурами СРБ исследователи обычно сталкиваются с проблемой ингибирования роста клеток при повышенных концентрациях ионов металлов в среде.

Многие СРБ чувствительны к повышенным концентрациям ионов двухвалентной меди. По имеющимся данным, устойчивость к меди большинства представителей СРБ рода *Desulfovibrio* довольно низкая. Для бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* G20 удельная скорость роста уменьшалась при концен-

трации ионов меди 0,4 мг/л [7], для других представителей этого рода рост ингибировался при 4–9 мг/л ионов меди (II) [8, 9]. Нами впервые описаны штаммы бактерий *Desulfovibrio* spp., устойчивые к меди (II) в концентрации до 2600 мг/л [10]. Бактерии *Desulfovibrio* sp. R2, выделенные из проб сточных вод предприятия «ПОЛТОМ» по производству шарикоподшипников, выдерживали концентрации ионов двухвалентной меди до 800 мг/л [8].

Одним из важных параметров, влияющих на восстановление сульфата в анаэробных осадках [11], а также на скорость сульфатредукции в осадках ветландов, загрязненных металлами, является температура [12]. Кроме того, она оказывает влияние и на продукцию сероводорода СРБ. Описаны случаи, когда оптимальные температуры для роста и дыхания бактерий отличались между собой, оптимум для дыхания клеток был выше, чем для роста их численности [13].

Целью данной работы являются определение оптимальной температуры роста для устойчивых к ионам меди бактерий *Desulfovibrio* sp. R2, изучение образующихся осадков сульфидов меди современными физико-химическими методами в условиях оптимальной температуры.

### Материалы и методы исследования

В работе были использованы бактерии штамма *Desulfovibrio* sp. R2, выделенные из проб сточных вод предприятия «ПОЛТОМ» и поддерживаемые в лаборатории биотехнологии и биоинженерии кафедры физиологии растений и биотехнологии Биологического института Томского государственного университета. Культивирование бактерий проводили в анаэробных условиях с использованием пресноводной среды Видделя [14] с лактатом в качестве донора углерода и электрона. Подробно культивирование устойчивых к меди изолятов СРБ описано нами ранее [8]. Визуальное наблюдение за ростом культуры проводили путем фазово-контрастного микроскопирования с использованием исследовательского микроскопа Axio Star (Carl Zeiss).

Влияние температуры на рост клеток и образование сероводорода в культуре бактерий оценивали по продукции биомассы (концентрации белка) и образованию сероводорода. Эксперименты по определению концентрации белка и сероводорода в процессе роста микроорганизма проводили в трех повторностях при температурах в диапазоне от +18 до +38°C. Питательную среду с инокулятом (10%) анаэробно разливали в пенициллиновые флаконы. Концентрацию белка определяли по модифицированному методу Лоури с использованием фенольного реактива Фолина [15]. Концентрацию сероводорода определяли спектрофотометрически по методике Пахмайера [16]. Кинетические параметры роста – удельную скорость ( $\mu$ ) и период удвоения культуры ( $T_d$ ) – определяли, используя данные о концентрации белка в разных временных точках [17]. Данные, полученные в ходе экспериментов, обрабатывались с помощью пакета Microsoft Office Excel 2003 и представлены в работе в виде средней со стандартным отклонением.

Для изучения образования сульфидов бактерии *Desulfovibrio* sp. R2 культивировали на среде Видделя с добавлением ионов меди в концентрации

250 мг/л по описанной методике [8]. Выращивание культуры проводили в течение 9 и 58 сут. Образовавшийся после культивирования осадок собирали и концентрировали на центрифуге Eppendorf 5804R (Германия) при 5000 об/мин в течение 10 мин. Полученный осадок высушивали на воздухе и измельчали до состояния порошка. Порошок исследовали с использованием сканирующего электронного микроскопа Philips SEM515 (Голландия). Энергодисперсионный анализ проводили с помощью микроанализатора EDAX. Съемка производилась при ускоряющем напряжении 30 kV, фокусное расстояние 12 мм, размер зонда 50–100 нм.

### Результаты исследования и обсуждение

#### Определение оптимальных температур роста и образования сероводорода

Изменение концентрации белка бактерий *Desulfovibrio* sp. R2 с течением времени при различных температурах показано на рис. 1. Кривые роста бактериальной культуры имели классический S-образный вид. Для каждой температуры культивирования определены продолжительность лаг-фазы, удельная скорость роста и период удвоения культуры (таблица).

#### Кинетические параметры роста, выход биомассы и сероводорода *Desulfovibrio* sp. R2 при разных температурах

T, °C	Лаг-фаза, ч	Удельная скорость роста, ч <sup>-1</sup>	Период удвоения, ч	Максимальная продукция белка, мг/л	Максимальная концентрация сероводорода, мг/л
18	23,5	0,067±0,02	10,9	185±40,8	52,9±8,67
22	24,5	0,086±0,01	8,24	181±5,27	68,9±3,75
28	19,5	0,07±0,01	10,1	217±20,25	66,2±4,8
32	8	0,29±0,05	2,44	189±13,5	67,2±1,05
35	4	0,37±0,15	2,12	184±5,06	56,8±1,26
38	10,5	0,21±0,05	3,43	212±6,39	67,2±0,88

Наименьшую продолжительность лаг-фазы (4 ч), максимальную скорость роста (0,37±0,15 ч<sup>-1</sup>) и наименьший период удвоения (2,12 ч) наблюдали при температуре культивирования +35°C. При понижении и повышении температуры продолжительность лаг-фазы увеличивалась до 23,5 ч при +18°C и 10,5 ч при +38°C. При снижении температуры с +32 до +28°C продолжительность лаг-фазы и период удвоения также возрастали.

Несмотря на то что максимальная скорость роста бактерий обнаружена при температуре +35°C (рис. 2), максимальную концентрацию биомассы наблюдали при +28°C, а сероводорода – при +22°C. В целом, кривые изменения концентрации сероводорода в среде с течением времени (см. рис. 3) соответствовали кривым роста бактериальной культуры (рис. 1). Следует заметить, что максимальные концентрации сероводорода в среде с культурой бактерий в исследованном диапазоне температур отличались незначительно (от 52,9±8,67 до 68,9±3,75

мг/л). Для дальнейшего изучения образования сульфидов меди бактериями была выбрана температура культивирования +28°C, т.к. именно при этой температуре образуется наибольшее количество биомассы.

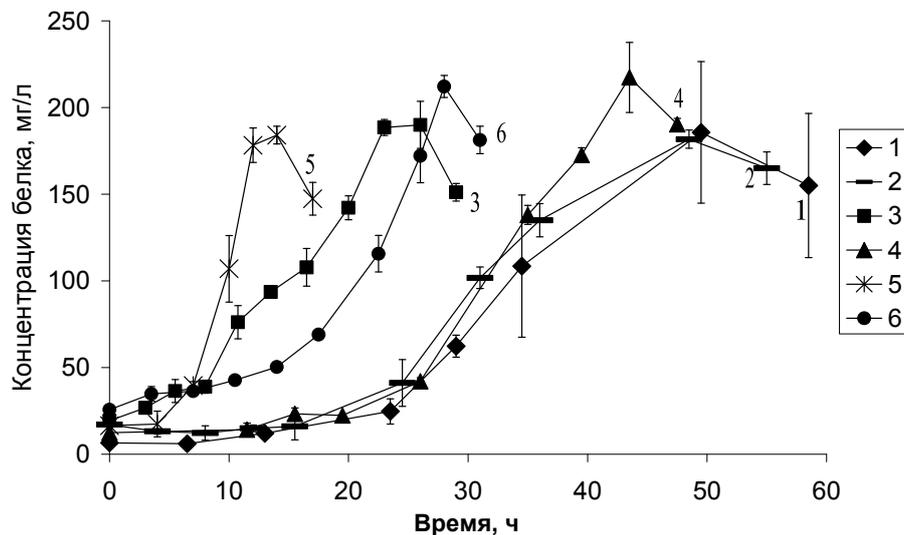


Рис. 1. Изменение концентрации белка в культуре бактерий *Desulfovibrio* sp. R2 с течением времени при культивировании в условиях разных температур: 1 – 18°C; 2 – 22°C; 3 – 32°C; 4 – 28°C; 5 – 35°C; 6 – 38°C

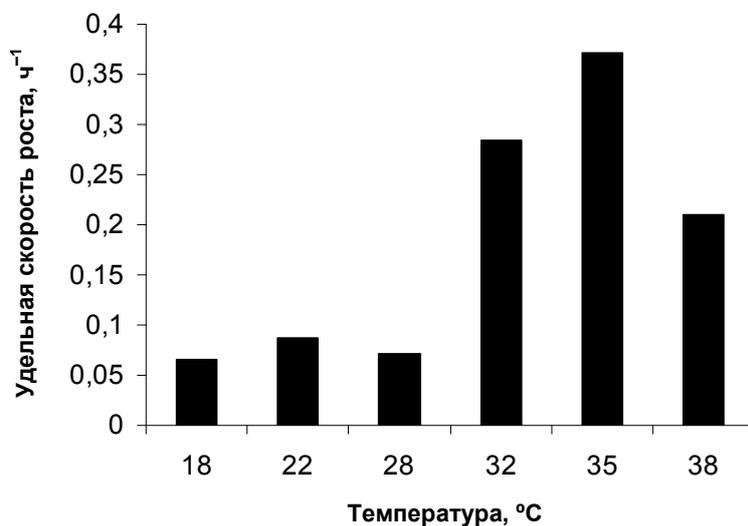


Рис. 2. Зависимость удельной скорости роста бактерий *Desulfovibrio* sp. R2 от температуры

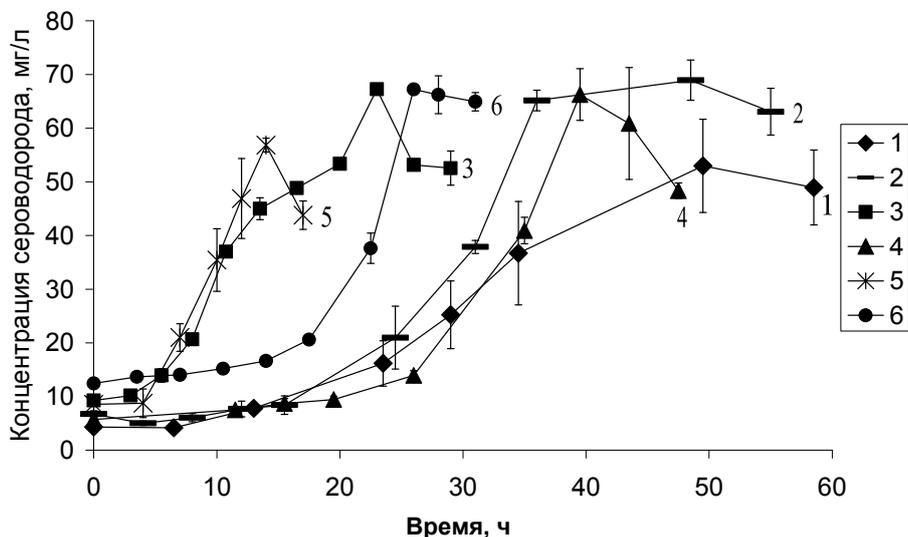
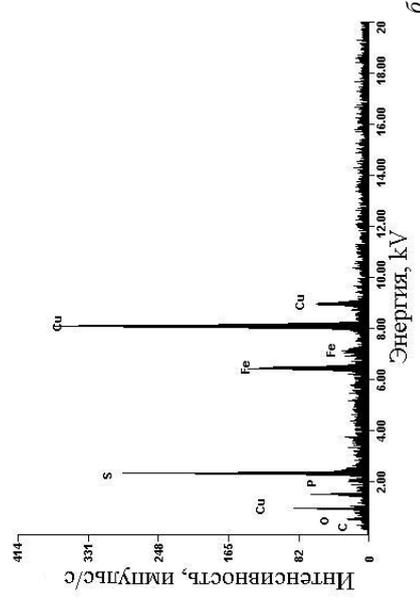
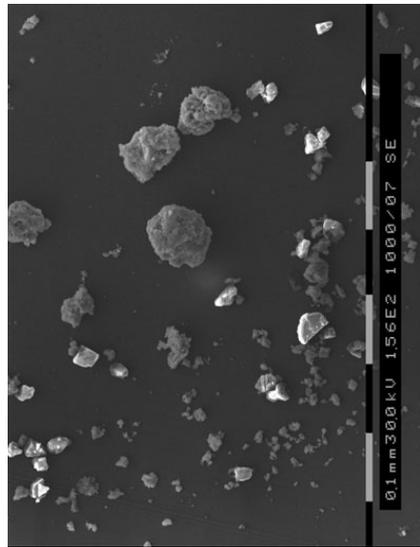


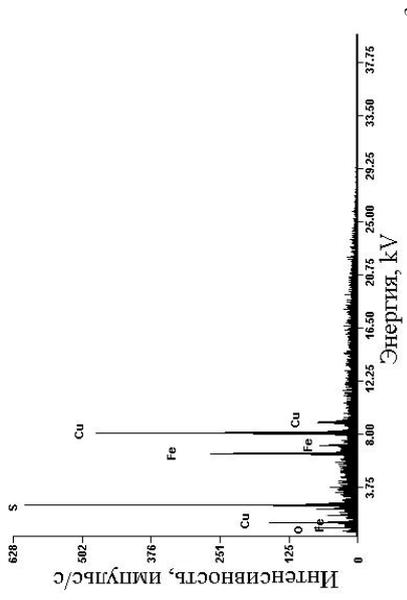
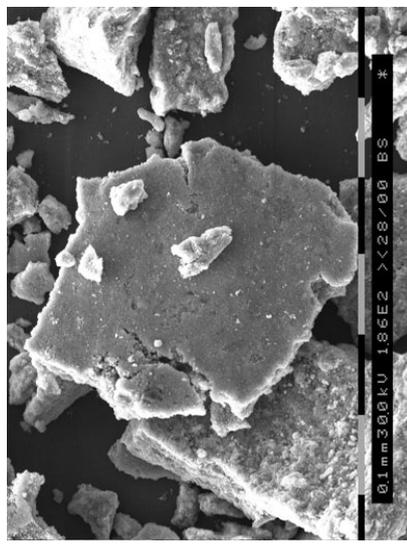
Рис. 3. Изменение концентрации сероводорода в культуре бактерий *Desulfovibrio* sp. R2 с течением времени при культивировании в условиях разных температур: 1 – 18°C; 2 – 22°C; 3 – 32°C; 4 – 28°C; 5 – 35°C; 6 – 38°C

### Образование сульфидов меди

Исследование размеров и элементного состава сульфидов меди, образованных бактериями *Desulfovibrio* sp. R2, проводили с помощью сканирующего микроскопа. Обнаружили, что средний размер частиц осадка составлял 75 мкм (рис. 4, а) при культивировании бактерий в течение 9 дней, в то время как при культивировании в течение 58 дней частицы имели более крупные размеры, до 300 мкм (рис. 4, в). Частицы осадков, наблюдаемые в контроле без инокулята, были значительно меньше (рис. 5, а), их средний размер составлял около 10 мкм. Энергодисперсионный анализ осадков показал, что основными элементами, входящими в состав осадков, образованных в среде бактериями штамма R2, являлись медь и сера, как в экспериментах с непродолжительным, так и более длительным периодом культивирования. Также в полученных спектрах присутствовали железо и в небольших количествах кислород, углерод и фосфор (рис. 4, б, г). Соотношение содержания в осадке серы и меди составляло 1:1,3 при непродолжительном культивировании бактерий штамма R2 – 9 сут и 1:1 при культивировании их в течение 58 сут. В контрольном образце основные пики соответствовали меди и кислороду. Также в контроле присутствовали железо и фосфор, а количество серы было значительно меньше, и его содержание к меди составляло 1:7,5.



а



б

Рис. 4. Микрофотографии и энергодисперсионные спектры осадков сульфидов меди, образованных бактериями *Desulfotribrio* sp. R2 при культивировании 9 дней (а, б) и 58 дней (в, г)

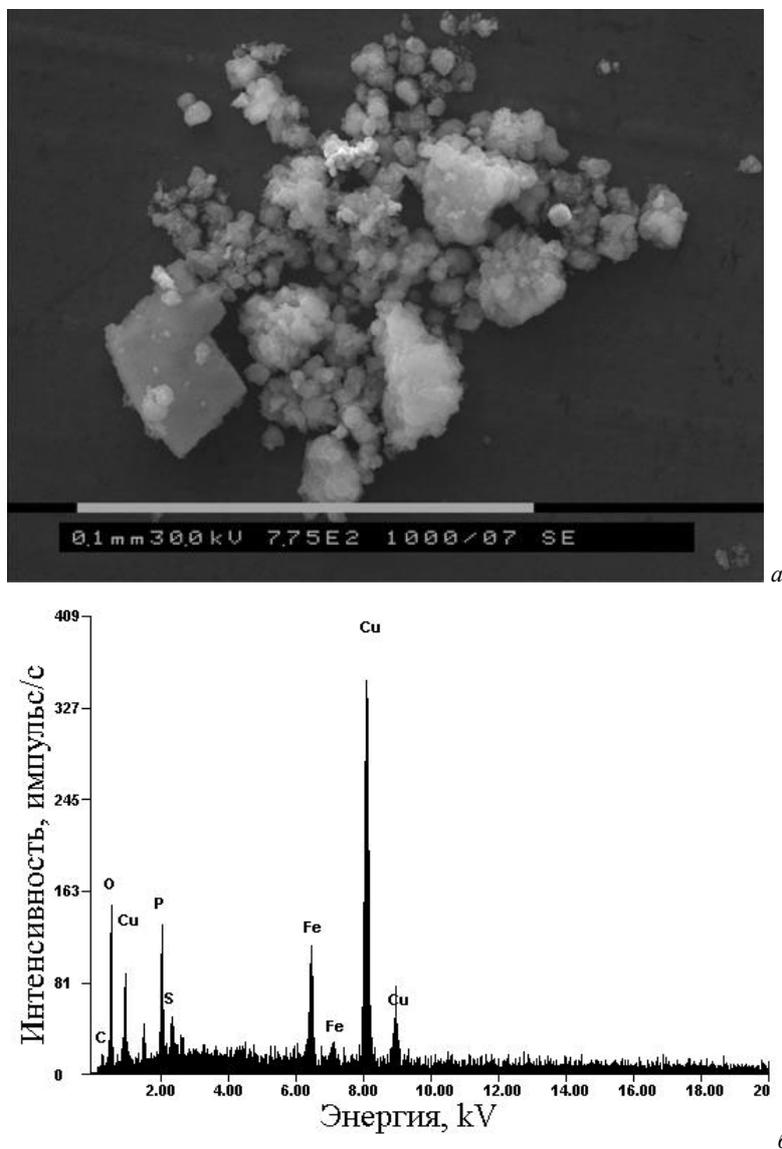


Рис. 5. Микрофотография (а) и энергодисперсионный спектр осадка (б), образованного в контроле без инокулята после 11 дней культивирования

Установлено, что оптимальная температура роста для бактерий штамма *Desulfovibrio* sp. R2, устойчивых к повышенным концентрациям меди, составляла +35°C. При этом максимальное количество микробной биомассы образовывалось при более низкой температуре, а максимальная концентрация сероводорода во всем исследованном интервале температур изменялась незначительно. Для экспериментов по изучению образования сульфидов меди была выбрана температура +28°C, т.к. именно в этих условиях образыва-

лась максимальная микробная биомасса. При образовании сульфидов клетки могут служить сайтами нуклеации будущих кристаллов, поэтому при оптимизации процесса образования биогенных сульфидов высокая плотность клеток в среде имеет большое значение. В случае промышленного применения процесса низкие температуры позволят снизить затраты на обеспечение энергией предприятия.

Соотношение атомов серы и меди, обнаруженное в биогенном осадке методом энергодисперсионного анализа, соответствовало минералу ковеллиту с химической формулой  $\text{CuS}$ . Образование ковеллита было ранее продемонстрировано в условиях накопительных [6] и чистых культур [10] СРБ. Возможно, первоначальное связывание серы с медью происходит в виде дефицитного по сере сульфида меди, т.к. соотношение  $\text{S}:\text{Cu}$  увеличивалось при более продолжительной инкубации и было близко к 1 после 58 сут культивирования. Вероятной кристаллической фазой на ранних стадиях культивирования может быть халькоцит ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ).

Возможно, в процессе культивирования происходит превращение одной формы сульфида в другую, т.к. известно, что различные формы сульфида меди в зависимости от температурных и других условий могут трансформироваться друг в друга.

Известно, что в условиях диагенетического образования сульфидов меди в природных условиях устанавливается равновесие между процессом образования сероводорода СРБ и переходом  $\text{S}^{2-}$  в твердую фазу [18]. При повышении концентрации сероводорода начальная форма  $\text{CuS}$  может сменяться борнитом ( $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$ ), а затем халькопиритом ( $\text{CuFeS}_2$ ). Присутствие на диаграммах пиков железа, как при культивировании в течение 9 дней, так и при более продолжительном культивировании, свидетельствует в пользу того, что борнит и халькопирит могут быть возможными кристаллическими фазами биогенного осадка. Возрастание соотношения  $\text{S}:\text{Cu}$  с увеличением срока инкубации свидетельствует о накоплении связанных сульфидов в осадке с течением времени. Небольшое количество серы, обнаруживаемое в контроле без инокулята, связано с внесением абиогенного сероводорода в форме  $\text{Na}_2\text{S}$  в питательную среду в качестве восстановителя. Теоретически в условиях питательной среды, использованной в наших экспериментах, могут образовываться нерастворимые соединения фосфата железа, о чем свидетельствуют небольшие пики фосфора, обнаруженные как в контроле без инокулята, так и в экспериментах на разных сроках культивирования. Присутствие кислорода может быть связано с частичным окислением меди до оксидов в процессе подготовки пробы для энергодисперсионного анализа.

Таким образом, температура  $+28^\circ\text{C}$  является оптимальной для получения сульфидов меди с использованием устойчивого к высоким концентрациям меди штамма бактерий *Desulfovibrio* sp. R2. Можно предположить наличие нескольких кристаллических фаз сульфидов меди и смешанных сульфидов меди и железа при биогенном осаждении двухвалентной меди, а также смену одних форм сульфидов другими при увеличении срока культивирования.

## Литература

1. Карначук О.В. Образование и растворение серосодержащих минералов сульфатредуцирующими бактериями: Автореферат дис. ... д-ра биол. наук. М., 2006. 53 с.
2. Kalin M., Cairns J., McCready R. Ecological engineering methods for acid-mine drainage treatment of coal wastes // Resour. Conserv. Recycl. 1991. Vol. 5. P. 26–275.
3. Каравайко Г.И., Кузнецов С.И., Голомзик А.И. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. М.: Наука, 1972. 248 с.
4. Baas-Becking L.G.M., Moore D. Biogenic sulfides // Econ. Geol. 1961. Vol. 56. P. 259–272.
5. McNeil M.B., Jones J.M., Little B.J. Mineralogical fingerprints for corrosion processes induced by sulfate reducing bacteria // NACE Annual Conference. 1991. Vol. 580. P. 1–16.
6. Gramp J.P., Sasaki K., Bigham J.M., Karnachuk O.V., Tuovinen O.H. Formation of Covellite (CuS) Under Biological Sulfate-Reducing Conditions // Geomicrobiology Journal. 2006. Vol. 23. P. 613–619.
7. Sani R.K., Peyton B.M., Brown L.T. Copper-induced inhibition of *Desulfovibrio desulfuricans* G20: assessment of its toxicity and correlation with those of zinc and lead // Appl. Environ. Microbiol. 2001. Vol. 67. P. 4765–4772.
8. Karnachuk O.V., Kurochkina S.Y., Nicomrat D., Frank Yu.A. et al. Copper resistance in *Desulfovibrio* strain R2 // Antonie van Leeuwenhoek. 2003. Vol. 83. P. 99–106.
9. Cabrera G., Perez R., Gomez J.M., A. balos A., Cantero D. Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio* sp. strains // J. Hazard Mater. 2006. Vol. 35. P. 40–46.
10. Karnachuk O.V., Sasaki K., Gerasimchuk A.L. et al. Precipitation of Cu-sulfides by Copper-tolerant *Desulfovibrio* Isolates // J. Geomicrobiol. 2008. Vol. 25. P. 219–227.
11. Russell N.J. Cold adaptation of microorganisms // Philosophical Transaction of the Royal Society of London Series B. 1990. Vol. 329. P. 595–611.
12. Karnachuk O.V., Pimenov N.V., Yusupov S.K., Frank Y.A. et al. Sulfate reduction potential in sediments in the Norilsk Mining area, Northern Siberia // J. Geomicrobiol. 2005. Vol. 22. P. 11–25.
13. Isaksen M.F., Jorgensen B.B. Adaptation of psychrophilic and psychrotrophic sulfate-reducing bacteria to permanently cold marine environments // Appl. Environ. Microbiol. 1996. Vol. 62. P. 408–414.
14. 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., 2<sup>nd</sup> edition, Berlin: Springer-Verlag. 1992. P. 3352–3378.
15. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.
16. Pachmayr F. Vorkommen und Bestimmung von Schwefelverbindungen in Mineralwasser. PhD thesis, University München, FRG. 1960. P. 238.
17. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика: Практический курс. М.: ФАИР-ПРЕСС, 1998. 720 с.
18. Лурье А.М. Происхождение медистых песчаников и сланцев // На основных направлениях науки. 1985. № 5. С. 102–112.

Поступила в редакцию 15.05.2010 г.

Ol'ga P. Butorova<sup>1</sup>, Anna V. Kozlova<sup>2</sup>, Anna L. Gerasimchuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Biological Institute of Tomsk State University, Tomsk, Russia

<sup>2</sup> Material Science Centre of Tomsk State University, Tomsk, Russia

#### FOR MOTION OF COPPER SULFIDES BY *DESULFOVIBRIO* SP. R2 UNDER OPTIMAL TEMPERATURE CONDITIONS

Sulfate-reducing bacteria play an important role in metal sulfide formation in anaerobic environments as well as various technological schemes. The major mechanism of metal precipitation by SRB is formation of insoluble sulfides. The study of metal sulfide formation, including copper, by pure cultures of SRB is hampered by metal ions toxicity to the bacteria. The copper-tolerant *Desulfovibrio* have been recently isolated and described (Karnachuk et al., 2003; Karnachuk et al., 2008). This study focuses on revealing the optimum temperature range for growth and sulfide production by copper-tolerant *Desulfovibrio* sp., R2 and examination of copper sulfides formed by the bacteria under the optimum temperature conditions.

Specific growth rate ( $\mu$ ), lag-phase and doubling time ( $T_d$ ) have been determined for *Desulfovibrio* sp. R2 growing in the batch culture with lactate as electron donor at the temperature range of +18 to +38°C. The maximum  $\mu$  of  $0,37 \pm 0,15 \text{ h}^{-1}$ , minimum lag-phase of 4 h, and doubling time of 2.12 h was observed under +35°C. The maximum sulfide concentration did not change substantially at the studied temperature range, and the maximum biomass production was detected at +28°C. This temperature has been chosen to study copper sulfide production because cell surface plays major role in initial metal binding. Cell wall also may be a nucleation site for the subsequent formation of crystalline metal sulfides.

Precipitates formed in *Desulfovibrio* sp. R2 spent cultures have been studied by scanning electron microscopy with energy dispersive spectroscopy (SEM-EDS). Short-term (9 days) incubation experiments resulted in production of smaller particles with the average size 75  $\mu\text{m}$  whereas particles up to 300  $\mu\text{m}$  were formed during long-term (58 days) incubations. Cu and S were major peaks revealed by EDS analysis. Cu also had an intense EDS signal in the control abiogenic precipitate obtained without SRB inoculum. On the other hand, abiogenic control showed only minor S peak. Cu:S ratio in biogenic precipitate was consistent with mineral covellite (CuS) under the long-term incubation. Minor peaks of Fe, P, and O occurred in both, experiment and control. These elements may be ascribed to the copper oxide and iron-copper-phosphates. The formation of mixed copper-iron sulfides is also possible under the biogenic incubation conditions.

**Key words:** sulfate-reducing bacteria; *Desulfovibrio*; copper sulfides; energy-dispersive analysis; scanning electronic microscopy.

Received May 15, 2010