

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.22

ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ НА АКТИВНОСТЬ АРХЕЙ
СЕМЕЙСТВА FERROPLASMACEAEА.Г. Булаев^{1,2,*}, Т.В. Ерофеева¹, К.С. Воробьева³, Г.Г. Челидзе³, А.А. Рамонова¹

¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Россия, 119071, г. Москва, Ленинский пр., д. 33, стр. 2;

³Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49

*e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Исследовано влияние органических веществ (глюкозы, фруктозы, рибозы, глицина, аланина, пирувата, ацетата, цитрата и дрожжевого экстракта), а также отходов пищевых производств (мелассы, барды, молочной сыворотки) на рост железоокисляющих ацидофильных микроорганизмов и на биоокисление двухвалентного железа. Объектами исследования были представители групп микроорганизмов, доминирующих в биогидрометаллургических процессах: археи семейства *Ferroplasmaceae* (*Acidiplasma aeolicum* V1^T, *A. cupricumulans* ВН2^T, *Acidiplasma* sp. МВА-1, *Ferroplasma acidiphilum* В-1) и бактерии рода *Sulfobacillus* (*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* SH 10-1, *S. thermotolerans* Кг1^T). Все исследованные штаммы наиболее активно росли и окисляли железо в средах с дрожжевым экстрактом, что, вероятно, объясняется наличием в его составе большого количества различных факторов роста, однако другие субстраты также обеспечивали как рост микроорганизмов, так и окисление железа.

Ключевые слова: ацидофильные микроорганизмы, биогидрометаллургия, *Sulfobacillus*, *Ferroplasmaceae*, миксотрофия, железоокисляющие микроорганизмы

Биогидрометаллургические технологии широко применяются для извлечения цветных и благородных металлов из сульфидных руд. Принципом, на котором основаны данные технологии, является деструкция кристаллической решетки сульфидных минералов ацидофильными железо- и сероокисляющими микроорганизмами [1]. Микроорганизмы, окисляющие сульфидные минералы, представляют собой филогенетически неоднородную группу, включающую несколько представителей *Bacteria* (*Proteobacteria*, *Nitrospirae*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*) и *Archaea* (*Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*) [2].

В процессе окисления сульфидных минералов выделяется тепло, поэтому и в промышленных реакторах биоокисления, и при кучном выщелачивании происходит разогрев до температур 40–50°C, при которых доминируют умеренно термофильные и термотолерантные микроорганизмы. В разных условиях состав микробных сообществ может быть различным [2], однако было показано, что в технологических процессах биоокисления сульфидных руд и концентратов часто доминируют бактерии рода *Sulfobacillus* и археи семейства *Ferroplasmaceae* родов *Acidiplasma* и *Ferroplasma*) [3–7], являющиеся экстремально ацидофильными умеренно-термофильными аэробными окислителями железа. Несмотря на то, что и бактерии рода *Sulfobacillus*, и археи семейства *Ferroplasmaceae* окисляют

двухвалентное железо, все известные представители данных групп нуждаются в органическом источнике углерода для стабильного роста, т.е. являются миксотрофами [2, 8].

Углеродный метаболизм бактерий рода *Sulfobacillus* детально изучен в нескольких работах [9–12]. Миксотрофия по углеродному питанию дает сульфобациллам преимущества перед облигатными автотрофами, так как скорость их роста намного выше, чем у облигатных автотрофов, окисляющих сульфидные минералы [12]. При этом интенсивность фиксации CO₂ у них соответствует интенсивности у ряда автотрофных микроорганизмов. Поэтому неспособность сульфобацилл к автотрофному росту, возможно, обусловлена недостаточным обеспечением клеток энергией при окислении неорганических субстратов [9–12]. Величины скорости окисления неорганических субстратов (пирита и тиосульфата) сульфобациллами были выше в миксотрофных условиях, чем в автотрофных, что связывают с повышением количества синтезируемого белка [13].

Углеродный метаболизм архей семейства *Ferroplasmaceae* изучен в меньшей степени. При описании типового вида *F. acidiphilum* сделан вывод о том, что он является автотрофом, но нуждается в органическом субстрате (дрожжевом экстракте – ДЭ) в качестве источника факторов роста [14]. В ряде

работ было отмечено, что представители Ferroplasmaceae нуждаются в ДЭ при росте в средах, содержащих двухвалентное железо, и обычно не способны расти в средах, содержащих только простые органические субстраты или двухвалентное железо [3, 4, 14, 15]. Например, штамм *A. cupricumulans* BH2^T не был способен расти в средах без ДЭ и железа [3]. Для штамма *F. thermophilum* L1^T была показана способность к росту в средах с железом, содержащих пептон или глюкозу [4]. Урожайность в этом случае была значительно ниже, чем в среде с ДЭ и железом, но подробные данные в работе не приводятся. Обобщение опубликованных данных об археях семейства Ferroplasmaceae позволяет заключить, что они нуждаются и в органических источниках углерода, и в двухвалентном железе, но не позволяет оценить влияние источников углерода на рост данных архей.

Изучение углеродного метаболизма бактерии рода *Sulfobacillus* и архей семейства Ferroplasmaceae весьма важно и с прикладной точки зрения. Было показано, что добавление в среду органического субстрата повышает эффективность процессов биовыщелачивания [5, 7]. С точки зрения технологии наиболее важно подобрать дешевый органический субстрат, который мог бы повысить эффективность процессов биоокисления сульфидных минералов.

Целью данной работы являлось исследование влияния различных органических соединений и отходов пищевых производств на рост архей семейства Ferroplasmaceae и бактерий рода *Sulfobacillus* и окисление ими двухвалентного железа.

Материалы и методы

Объектами исследования были штаммы бактерий рода *Sulfobacillus* и архей семейства Ferroplasmaceae: *S. thermosulfidooxidans* SH 10-1; *S. thermotolerans* Krl^T; *Acidiplasma* sp. MBA-1; *A. aeolicum* V1^T; *A. cupricumulans* BH2^T; *F. acidiphilum* B-1. Для экспериментов была использована среда, содержащая минеральные соли (г/л): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,4; $(NH_4)_2SO_4$ – 0,2; KCl – 0,1; K_2HPO_4 – 0,1; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 28; pH среды был около 1,0 – для штаммов *Acidiplasma* sp. MBA-1, *A. cupricumulans* BH2^T, *F. acidiphilum* B-1 и 1,5–1,6 – для штаммов *A. aeolicum* V1^T, *S. thermosulfidooxidans* SH 10-1, *S. thermotolerans* Krl^T. Эксперименты проводили при температурах, близких к оптимальным для роста микроорганизмов: 50°C – для штаммов *Acidiplasma* sp. MBA-1, *A. cupricumulans* BH2^T, *S. thermosulfidooxidans* SH 10-1; 40°C – для штаммов *A. aeolicum* V1^T, *S. thermotolerans* Krl^T, *F. acidiphilum* B-1. Продолжительность экспериментов составляла 20 ч, штаммы культивировали на ротационном шейкере (200 об./мин.) в пенициллиновых флаконах с 3 мл среды. Начальная численность клеток составляла примерно $1 \cdot 10^7$ кл./мл.

Исследовали влияние следующих органических субстратов: ДЭ, глюкозы, фруктозы, рибозы, гли-

цина, аланина, пирувата (натриевая соль), ацетата (натриевая соль), цитрата, а также органических отходов: мелассы, барды и молочной сыворотки (МС). Согласно информации производителя (“Хеликон”, Россия) содержание углерода в ДЭ составляло примерно 50% от сухого веса. В экспериментах использовали среды, содержащие 0,01%, 0,02%, 0,05% и 0,10% ДЭ. Все органические вещества использовали в концентрациях, которые соответствовали по содержанию углерода вышеуказанным концентрациям ДЭ. Органические отходы вносили в среду в концентрациях 0,01%, 0,02%, 0,05% и 0,1%. Все органические субстраты готовили отдельно от основной среды в виде 10%-ных растворов, которые стерилизовали фильтрованием через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Поскольку спиртовая барда содержит нерастворимые в воде компоненты, готовили суспензию, содержащую 10% спиртовой барды (в пересчете на сухую массу), и стерилизовали ее автоклавированием при 0,5 ати. Был проведен эксперимент с одновременным внесением в среду глюкозы и раствора витаминов группы В [16]. В качестве контроля использовали среду без органических субстратов.

При проведении экспериментов определяли концентрации ионов трех- и двухвалентного железа методом трилонометрического титрования [17], а также численность микроорганизмов путем прямого счета с помощью фазово-контрастной микроскопии.

Все приводимые в работе цифровые значения получены в двух независимых опытах. В таблицах представлены среднеарифметические значения и 95%-ные доверительные интервалы ($n = 4$, $\alpha = 0,05$). Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы MS Excel 2013.

Результаты и обсуждение

S. thermosulfidooxidans SH 10-1 окислил за 20 ч около 80% Fe^{2+} в среде с 0,02%, 0,05% и 0,1% ДЭ (в автотрофных условиях – только 28%). В средах с другими органическими веществами железо тоже окислялось достаточно активно (от 30% до 50%). Исключение составлял пируват, в присутствии которого окисления Fe^{2+} практически не наблюдалось (было окислено от 5% до 8% Fe^{2+}). Несмотря на достаточно активное окисление железа, прирост клеток на средах с органическими соединениями оставался низким по сравнению с приростом в присутствии ДЭ: в среде с ДЭ штамм достиг численности порядка $1-2 \cdot 10^8$ кл./мл, в других вариантах эксперимента прирост численности был незначительным (максимальная численность в среде с глюкозой и аланином составила около $5 \cdot 10^7$ кл./мл). Внесение витаминов в среду с глюкозой не привело к увеличению скорости окисления железа и урожайности. Достаточно высокими степени окисления железа были в средах, содержащих органические отходы (в среде с бардой было окислено до 80% железа), но численность клеток была значительно более низкой, чем в среде с ДЭ.

Таблица 1

Степень окисления двухвалентного железа (%) исследуемыми штаммами после 20 ч инкубации;
1, 2, 3, 4 – концентрации органических веществ, соответствующие 0,01%, 0,02%, 0,05% и 0,1% ДЭ

Субстрат	Концентрация	<i>S. thermosulfido-oxidans</i> SH 10-1	<i>S. thermotolerans</i> Kr1 ^T	<i>A. aeolicum</i> V1 ^T	<i>A. cupricumulans</i> BH2 ^T	<i>Acidiplasma</i> SP. MBA-1	<i>F. acidiphilum</i> B-1
Автотрофные условия	–	26±8	30±5	15±11	21±2	15±13	15±2
ДЭ	0,01%	48±12	98±2	19±9	97±4	41±16	59±1
	0,02%	79±27	99±1	39±8	100±0	74±18	56±4
	0,05%	87±9	88±6	38±15	100±0	78±12	58±7
	0,10%	86±15	93±2	40±15	100±0	79±17	53±3
Глюкоза	1	42±17	73±31	27±16	40±24	25±5	21±7
	2	44±20	75±24	24±13	50±21	21±8	26±7
	3	51±15	74±26	23±15	42±26	25±10	24±8
	4	56±17	72±32	17±9	50±21	25±10	19±9
Глюкоза + Витамины	1	26±3	45±6	16±2	21±2	20±6	27±1
	2	35±12	44±8	14±1	30±7	18±9	28±2
	3	43±18	49±3	14±1	36±2	38±5	31±1
	4	15±12	43±2	13±4	36±3	18±3	27±6
Фруктоза	1	44±1	100±0	19±6	51±3	25±1	22±3
	2	42±9	100±0	23±2	59±1	25±3	18±1
	3	50±10	100±0	16±7	61±2	23±2	20±3
	4	48±5	100±0	21±1	43±27	26±3	15±1
Рибоза	1	42±3	100±0	22±3	59±1	31±1	10±1
	2	47±5	100±0	19±2	67±2	27±3	10±1
	3	54±6	100±0	20±4	86±20	25±3	13±1
	4	58±1	100±0	21±7	76±9	26±1	14±1
Глицин	1	48±2	100±0	18±3	56±9	26±1	17±1
	2	48±1	100±0	20±6	51±7	27±2	16±2
	3	44±4	100±0	19±2	31±8	19±12	21±1
	4	46±2	100±0	16±2	48±6	18±8	13±1
Аланин	1	58±3	100±0	19±2	55±1	27±1	11±1
	2	57±6	100±0	20±4	58±3	27±3	15±1
	3	53±4	100±0	18±1	53±4	27±1	18±1
	4	54±2	100±0	21±2	56±2	29±1	17±3
Пируват	1	7±2	78±1	7±2	45±2	25±1	3±1
	2	8±1	79±4	8±2	40±4	27±6	7±1
	3	5±1	49±3	2±1	4±1	33±2	1±1
	4	6±1	30±3	2±1	2±1	8±2	1±0
Ацетат	1	50±1	100±0	18±3	56±2	33±2	16±3
	2	47±1	100±0	21±1	50±2	32±2	13±3
	3	39±1	96±6	16±1	71±20	29±2	20±3
	4	29±2	72±2	22±1	50±1	32±3	12±2
Цитрат	1	43±15	100±0	11±5	53±2	27±3	13±1
	2	55±2	100±0	19±1	64±8	27±6	11±1
	3	57±1	100±0	21±4	60±9	25±7	14±3
	4	33±7	100±0	12±6	73±4	33±1	13±3
Меласса	0,01%	23±4	55±4	9±4	45±3	32±3	30±1
	0,02%	37±5	54±1	13±2	38±3	12±3	31±4
	0,05%	53±12	35±10	12±8	43±5	22±2	31±1
	0,10%	33±10	6±3	7±1	43±5	30±2	23±2
Барда	0,01%	67±1	53±2	11±2	30±5	20±6	32±4
	0,02%	63±1	52±1	15±3	32±2	24±3	23±11
	0,05%	75±9	56±4	23±4	38±3	29±2	33±4
	0,10%	79±4	51±2	19±2	51±3	32±2	35±2
МС	0,01%	5±1	41±19	25±7	27±2	46±3	38±1
	0,02%	57±4	65±6	20±2	32±7	47±7	36±2
	0,05%	52±4	73±2	26±1	55±2	59±2	41±1
	0,10%	18±5	80±2	13±1	66±3	73±3	46±1

Штамм *S. thermotolerans* K1^T окислял железо быстрее, чем *S. thermosulfidooxidans* SH 10-1 (в большинстве экспериментов он окислил железо почти полностью). При этом степень окисления в контрольном эксперименте составила около 30%, а прирост численности был достаточно низким по сравнению со средами, содержащими ДЭ. Добавление раствора витаминов также не привело к увеличению скорости окисления железа и численности клеток штамма. При росте в среде с органическими отходами железо окислялось медленнее, чем в среде с ДЭ, и численность клеток штамма была значительно ниже, чем в среде с ДЭ (в 4–10 раз).

Штамм *A. aeolicum* V1^T за 20 ч достиг относительно невысокой степени окисления железа (она была максимальной в средах с ДЭ – около 40%). Степень окисления железа в экспериментах со всеми органическими веществами была примерно в два раза ниже, чем в экспериментах с ДЭ (18–20%), за исключением вариантов с пируватом, где степень окисления была крайне низкой (от 2% до 8%, т.е. значительно ниже, чем в автотрофных условиях). Прирост численности клеток был максимальным в средах с ДЭ (до $9 \cdot 10^7$ кл./мл), а при росте в средах с органическими субстратами численность достигала $2\text{--}3 \cdot 10^7$ кл./мл. Исключение составляла глюкоза, в средах с которой численность была относительно высокой (до $6\text{--}7 \cdot 10^7$ кл./мл). Добавление витаминов к среде с глюкозой не привело к увеличению скорости окисления железа, но численность клеток в среде с глюкозой и витаминами была несколько выше – например, в варианте с самой высокой концентрацией глюкозы добавление витаминов позволило достичь численности около $1 \cdot 10^8$ кл./мл. В экспериментах с органическими отходами степень окисления и прирост численности клеток штамма были значительно ниже, чем в средах с ДЭ (в 2–3 раза).

В экспериментах с *A. cupricumulans* ВН2^T скорость окисления Fe^{2+} была значительно выше, чем в аналогичных экспериментах со штаммом *A. aeolicum* V1^T. В присутствии ДЭ железо было окислено практически полностью. Достаточно высокими были степени окисления в присутствии почти всех органических веществ (30% и выше), но высокие концентрации пирувата ингибировали окисление. Различия между средами по численности клеток были более значительными, чем по степени окисления железа. В среде с 0,02% ДЭ численность клеток достигала приблизительно $24 \cdot 10^7$ кл./мл, а в присутствии ДЭ в других концентрациях численность была в 2–3 раза ниже. В средах с другими субстратами численность была ниже (не более $6 \cdot 10^7$ кл./мл). Добавление витаминов достаточно сильно влияло на рост штамма *A. cupricumulans* ВН2^T. Степень окисления железа в среде с витаминами была несколько ниже, чем в среде с глюкозой, тогда как численность клеток была в 3–4 раза выше ($16\text{--}18 \cdot 10^7$ и $4\text{--}5 \cdot 10^7$ кл./мл соответственно). Ве-

роятно, штамм *A. cupricumulans* ВН2^T в большей степени зависел от присутствия в среде таких факторов роста, как витамины группы В. Этим можно объяснить и различия в урожайности между средами, содержащими ДЭ или раствор витаминов и другие органические вещества. В экспериментах с органическими отходами степень окисления железа была в 2–3 раза ниже, чем в присутствии ДЭ, но на средах с мелассой и МС численность клеток была высокой (до $20 \cdot 10^7$ кл./мл).

У штамма *Acidiplasma* sp. МВА-1 степень окисления железа и урожайность были наиболее высокими в средах с ДЭ (от $4 \cdot 10^7$ до $12 \cdot 10^8$ кл./мл, с максимумом в среде с 0,05% ДЭ). Окисление Fe^{2+} в большой степени зависело от присутствия ДЭ, и в экспериментах с органическими веществами степень окисления была в 3–4 раза ниже, чем в экспериментах с ДЭ. В большинстве экспериментов скорость окисления не менялась значительно или увеличивалась при увеличении концентрации органических веществ, но пируват в наиболее высокой концентрации ингибировал и окисление железа, и рост штамма. Степень окисления железа в среде с пируватом была ниже, чем в контроле (8% и 15% соответственно). Добавление раствора витаминов к среде с глюкозой не привело к значительному увеличению скорости окисления и численности клеток. В экспериментах с органическими отходами было показано, что степень окисления железа и численность клеток штамма были наиболее высокими в экспериментах с бардой. Степени окисления Fe^{2+} в средах с ДЭ и бардой различались 2–2,5 раза, а численность клеток – в 2–6 раз. Степень окисления железа и численность клеток штамма в экспериментах с мелассой и молочной сывороткой были ниже, чем в соответствующих вариантах с бардой.

Штамм *F. acidiphilum* В-1 окислял железо относительно медленно, наиболее быстро оно происходило в присутствии ДЭ (было окислено около 50% двухвалентного железа). Степень окисления железа на средах с органическими соединениями не превышала достоверно степень окисления в контрольном варианте (15%). Пируват ингибировал окисление (было окислено не более 7% железа). Аналогичная зависимость наблюдалась и для урожайности. Численность клеток была максимальной в среде с 0,05% ДЭ (около $13 \cdot 10^7$ кл./мл), а в контрольном варианте она составила приблизительно $2,5 \cdot 10^7$ кл./мл. В средах с другими органическими веществами численность клеток была не намного выше, чем в контрольном эксперименте. В присутствии пирувата и ацетата роста практически не наблюдалось. Внесение витаминов не оказало значительного влияния на окисление железа и на рост штамма. В экспериментах с органическими отходами степень окисления железа и урожайность были ниже, чем в присутствии ДЭ, но выше, чем на средах с органическими веществами. Было окислено от 30% до 40% железа, а численность достигала значений от $5\text{--}6 \cdot 10^7$ кл./мл

Таблица 2

Численность клеток исследуемых штаммов ($\cdot 10^7$ кл./мл) после 20 ч инкубации; 1, 2, 3, 4 – концентрации органических веществ, соответствующие 0,01%, 0,02%, 0,05% и 0,1% ДЭ

Субстрат	Концентрация	<i>S. thermosulfido-oxidans</i> SH 10-1	<i>S. thermotolerans</i> Kr1 ^T	<i>A. aeolicum</i> V1 ^T	<i>A. cupricumulans</i> BH2 ^T	<i>Acidiplasma</i> sp. MBA-1	<i>F. acidiphilum</i> B-1
Автотрофные условия	–	2,9±0,6	2,9±1,6	2,8±0,6	2,7±1,3	5,6±2,8	2,5±0,7
ДЭ	0,01%	6,0±3,4	7,1±1,0	8,6±3,11	7,6±4,4	47,4±15,8	10,1±0,5
	0,02%	11,1±6,8	9,2±1,4	9,1±4,11	23,6±6,5	43,8±13,5	10,7±1,2
	0,05%	19,5±7,0	21,0±5,7	8,5±1,4	11,6±5,4	122,9±38,3	13,5±2,4
	0,10%	15,2±4,6	20,1±4,8	6,1±2,3	12,6±5,4	70,1±22,2	12,4±3,4
Глюкоза	1	3,4±0,9	2,7±1,2	4,3±1,6	5,8±1,8	8,2±3,4	3,7±2,3
	2	3,1±0,9	3,4±0,1	7,3±0,6	4,4±1,4	9,8±3,8	5,5±2,9
	3	4,8±3,2	7,0±4,3	6,7±1,4	4,1±1,3	10,9±4,5	4,1±0,9
	4	4,2±1,6	3,4±1,0	5,2±3,5	3,8±1,9	9,1±3,9	3,1±1,9
Глюкоза + Витамины	1	3,3±0,4	3,2±0,4	7,8±0,8	16,5±2,1	6,3±0,5	4,1±0,2
	2	3,6±0,1	3,2±0,2	8,7±2,8	18,9±0,8	4,4±0,3	3,5±0,5
	3	2,8±0,1	3,6±0,5	9,7±0,8	16,8±0,4	9,5±4,1	6,2±2,2
	4	3,5±0,1	4,0±1,1	10,8±2,5	18,3±1,1	8,7±0,8	2,4±0,4
Фруктоза	1	1,9±0,7	6,2±0,9	2,8±0,5	5,8±0,9	7,2±2,4	3,0±0,3
	2	2,5±0,3	5,4±0,8	1,3±0,7	3,2±0,4	14,7±2,2	2,0±0,3
	3	2,9±1,2	4,3±1,2	4,3±0,8	1,2±0,4	13,6±0,1	3,5±0,8
	4	1,3±0,7	5,4±0,5	2,4±0,3	0,8±0,1	14,4±1,6	3,8±0,1
Рибоза	1	1,1±0,5	4,3±0,3	1,6±0,28	0,6±0,4	12,6±2,8	3,1±0,1
	2	3,1±1,4	1,9±0,7	2,2±0,5	1,0±0,7	11,9±0,4	1,4±0,4
	3	2,2±0,9	4,9±0,1	3,2±0,1	4,1±0,3	14,6±1,8	1,6±0,1
	4	2,2±0,8	4,7±0,7	2,0±0,3	3,0±0,8	11,5±4,9	1,9±0,1
Глицин	1	1,2±0,4	4,3±0,1	3,6±0,1	6,5±3,1	4,7±0,4	3,5±0,3
	2	1,4±0,3	8,5±0,3	3,8±0,9	5,6±1,4	6,9±0,4	1,8±0,1
	3	1,9±0,5	7,9±0,7	3,6±0,4	5,4±0,5	7,4±3,7	3,1±0,4
	4	2,2±0,8	3,3±0,5	1,1±0,3	5,9±3,6	7,5±0,4	2,9±0,1
Аланин	1	2,5±1,4	3,5±0,3	2,5±0,1	5,1±4,8	7,3±2,5	0,9±0,3
	2	4,7±0,9	3,8±0,9	4,1±0,5	3,7±2,6	12,8±1,7	0,7±0,1
	3	5,1±0,1	6,5±0,8	1,6±0,3	6,0±1,7	12,6±4,4	1,8±0,1
	4	4,5±0,7	4,4±0,5	4,4±0,3	1,1±0,3	12,7±0,1	3,3±0,3
Пируват	1	1,6±0,1	9,9±0,4	2,0±0,3	2,3±1,2	1,5±0,3	2,2±0,5
	2	1,4±0,1	4,1±1,0	0,9±0,1	2,2±0,5	3,4±0,4	0,8±0,1
	3	1,5±0,3	3,3±0,5	0,9±0,3	0,9±0,8	5,2±1,4	1,0±0,1
	4	1,8±0,3	5,4±0,5	0,7±0,4	0,6±0,4	2,9±1,2	1,1±0,5
Ацетат	1	2,0±0,5	3,4±0,9	0,9±0,5	4,3±0,9	8,5±0,8	1,6±0,7
	2	0,9±0,2	2,7±0,7	0,9±0,14	2,8±0,3	6,0±0,4	1,7±0,3
	3	1,0±0,1	3,5±0,3	0,7±0,1	1,3±0,3	9,3±1,9	0,6±0,3
	4	1,8±0,1	4,2±0,7	0,6±0,3	0,8±0,4	4,9±1,3	0,7±0,3
Цитрат	1	1,9±1,0	3,8±0,1	1,9±0,4	3,3±0,3	3,8±1,4	0,9±0,3
	2	2,0±0,5	3,5±0,5	0,8±0,1	2,7±1,3	6,7±0,3	1,9±0,4
	3	1,9±0,5	2,8±0,8	2,9±0,8	2,2±0,3	12,1±1,2	1,9±0,1
	4	1,3±0,3	2,1±0,6	3,3±0,8	0,8±0,4	11,5±0,8	1,4±0,1
Меласса	0,01%	3,5±0,3	3,1±0,3	3,4±0,1	14,4±0,2	9,4±4,2	6,4±0,6
	0,02%	3,8±0,5	2,2±0,1	3,4±0,1	17,3±2,6	16,4±0,2	5,1±3,0
	0,05%	4,2±1,0	3,3±1,0	3,8±0,84	15,8±1,6	12,5±4,2	4,5±1,4
	0,10%	3,7±0,7	1,3±0,3	3,9±0,3	17,4±0,4	10,5±0,2	4,6±2,2
Барда	0,01%	4,6±0,8	3,4±0,3	2,4±0,4	5,5±3,0	6,1±1,5	8,0±0,7
	0,02%	4,2±1,0	3,2±0,1	4,1±0,5	5,8±2,9	9,1±0,3	6,7±2,5
	0,05%	4,4±1,6	3,3±1,0	4,9±1,1	8,7±2,6	10,4±3,4	6,9±3,3
	0,10%	7,9±0,4	3,7±0,6	5,0±0,7	7,2±0,6	11,3±1,2	6,6±0,7
МС	0,01%	4,0±0,2	3,4±1,0	2,3±0,3	6,9±0,2	11,1±0,2	6,5±1,3
	0,02%	5,7±1,3	3,3±0,5	2,3±0,4	7,9±1,0	15,9±10,2	6,2±1,8
	0,05%	6,0±1,3	4,9±1,0	3,6±0,9	12,9±1,0	19,3±4,5	8,0±0,2
	0,10%	5,0±0,1	6,5±1,4	4,6±0,6	18,1±0,4	19,9±4,4	9,5±3,0

в средах с мелассой до $6,5-9,5 \cdot 10^7$ кл./мл в средах с МС и бардой.

Все исследованные штаммы наиболее активно росли и окисляли железо при росте в средах с ДЭ, другие субстраты также обеспечивали рост и окисление железа микроорганизмами, но численность клеток и скорость окисления были более низкими. Это, очевидно, объясняется наличием в составе ДЭ большого количества различных факторов роста. Такие субстраты, как меласса, барда и МС, содержащие достаточно большое количество различных органических соединений, включая витамины и аминокислоты [18–20], также обеспечивали относительно быстрый рост штаммов. Добавление раствора витаминов группы В к среде с глюкозой не приводило к значительному увеличению урожайности штаммов. Единственным исключением был штамм *A. cupricumulans* ВН2^Т. Пируват и ацетат в некоторых экспериментах ингибировали рост микроорганизмов. Это объясняется тем, что слабые органические кислоты не диссоциируют при низких рН, а их молекулы легко проникают через клеточ-

ную мембрану и снижают внутрицитоплазматический рН [21].

Таким образом, ДЭ является оптимальным органическим субстратом для всех исследованных штаммов, однако и другие субстраты, включая отходы пищевого производства, также могут быть использованы в качестве источника углерода для культивирования микроорганизмов. Полученные результаты могут служить основой для планирования дальнейших фундаментально-научных и прикладных исследований. В частности, для архей семейства *Ferroplasmaceae* роль органических и неорганических субстратов в энергетическом метаболизме детально еще не изучена. Кроме того, необходимо проведение прикладных исследований для определения возможности использования органических отходов для интенсификации промышленных процессов биовыщелачивания.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 16–34–60053 мол_а_дк.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Johnson D.B. Biomining — biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014. Vol. 30. P. 24–31.
2. Schippers A. Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification // *Microbial Processing of Metal Sulfides* / Eds. E.R. Donati and W. Sand. N.Y.: Springer, 2007. P. 3–33.
3. Hawkes R.B., Franzmann P.D., O'Hara G., Plumb J.J. *Ferroplasma cupricumulans* sp. nov., a novel moderately thermophilic, acidophilic archaea isolated from an industrial-scale chalcocite bioleach heap // *Extremophiles*. 2006. Vol. 10. N 6. P. 525–530.
4. Zhou H., Zhang R., Hu P., Zeng W., Xie Y., Wu C., Qiu G. Isolation and characterization of *Ferroplasma thermophilum* sp. nov., a novel extremely acidophilic, moderately thermophilic archaeon and its role in bioleaching of chalcopyrite // *J. Appl. Microbiol.* 2008. Vol. 105. N 2. P. 591–601.
5. Li Q., Tian Y., Fu X., Yin H., Zhou Z., Liang Y., Qiu G., Liu J., Liu H., Liang Y., Shen L., Cong J., Liu X. The community dynamics of major bioleaching microorganisms during chalcopyrite leaching under the effect of organics // *Curr. Microbiol.* 2011. Vol. 63. N 2. P. 164–172.
6. van Hille R.P., van Wyk N., Froneman T., Harrison S.T.L. Dynamic evolution of the microbial community in BIOX leaching tanks // *Adv. Mater. Res.* 2013. Vol. 825. P. 331–334.
7. Muravyov M.I., Bulaev A.G. Two-step oxidation of a refractory gold-bearing sulfidic concentrate and the effect of organic nutrients on its biooxidation // *Miner. Eng.* 2013. Vol. 45. P. 108–114.
8. Golyshina O.V., Timmis K.N. *Ferroplasma* and relatives, recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments // *Environ. Microbiol.* 2005. Vol. 7. N 9. P. 1277–1288.
9. Zakharchuk L.M., Egorova M.A., Krasil'nikova E.N., Tsaplina I.A., Bogdanova T.I., Melamud V.S., Karavaiko G.I. Activity of the enzymes of carbon metabolism in *Sulfobacillus sibiricus* under various conditions of cultivation // *Microbiol. Eng.* 2003. Vol. 72. N 5. P. 553–557.
10. Захарчук Л.М., Цаплина И.А., Красильникова Е.Н., Богданова Т.И., Каравайко Г.И. Метаболизм углерода у *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* // *Микробиол.* 1994. Т. 63. № 4. С. 573–580.
11. Karavaiko G.I., Tsaplina I.A., Bogdanova T.I., Krasil'nikova E.N., Zakharchuk L.M. Growth and carbohydrate metabolism of sulfobacilli // *Microbiology*. 2001. Vol. 70. N 3. P. 245–250.
12. Egorova M.A., Zakharchuk L.M., Krasil'nikova E.N., Tsaplina I.A., Bogdanova T.I. Effect of cultivation conditions on the growth and activities of sulfur metabolism enzymes and carboxylases of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. *asporogenes* strain 41 // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2004. Vol. 40. N 4. P. 381–387.
13. Вартамян Н.С., Каравайко Г.И., Пивоварова Т.А. Влияние органических веществ на рост и окисление неорганических субстратов *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. *asporogenes* // *Микробиол.* 1990. Т. 59. N 3. С. 411–417.
14. Golyshina O.V., Pivovarova T.A., Karavaiko G.I., Kondrat'eva T.F., Moore E.R.B., Abraham W., Lünsdorf H., Timmis K.N., Yakimov M.M., Golyshin P.N. *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the *Archaea* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000. Vol. 50. N 3. P. 997–1006.
15. Golyshina O.V., Yakimov M.M., Lünsdorf H., Ferrer M., Nimtz M., Timmis K.N., Wray V., Tindall B.J., Golyshin P.N. *Acidiplasma aeolicum* gen. nov., sp. nov., a euryarchaeon of the family *Ferroplasmaceae* isolated from a hydrothermal pool, and transfer of *Ferroplasma cupricumulans* to *Acidiplasma cupricumulans* comb. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. Vol. 59. N 11. P. 2815–2824.
16. Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. Formation of methane by bacterial extracts // *J. Biol. Chem.* 1963. Vol. 238. N 6. P. 2882–2886.

17. Schwarzenbach G., Flaschka H. Complexometric titrations. London: Methuen, 1969. 490 pp.

18. Delaney R.A.M. Composition, properties and uses of whey protein concentrates // J. Soc. Dairy Technol. 1976. Vol. 29. N 2. P. 91–101.

19. Kristiansen B., Linden J., Matthey M. Citric acid biotechnology. London: Taylor & Francis, 2002. 189 pp.

20. Krzywonos M., Cibis E., Mi kiewicz T., Ryznar-Luty A. Utilization and biodegradation of starch stillage (distillery

wastewater) // Electron. J. Biotechnol. 2009. Vol. 12. N 1. DOI: 10.2225/vol12-issue1-fulltext-5.

21. Borischewski R.M. Keto acids as growth-limiting factors in autotrophic growth of *Thiobacillus thiooxidans* // J. Bacteriol. 1967. Vol. 93. N 2. P. 597–599.

Поступила в редакцию
26.02.2018 г.

Принята к печати
30.05.2018 г.

MICROBIOLOGY

EFFECT OF ORGANIC NUTRIENTS ON THE ACTIVITY OF ARCHAEA OF THE FERROPLASMACEAE FAMILY

A.G. Bulaev^{1,2,*}, T.V. Erofeeva¹, K.S. Vorobeva³, G.G. Chelidze³, A.A. Ramonova¹

¹Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Leninsky Ave. 33–2, Moscow, 119071, Russia;

³Russian State Agrarian University-Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Timiryazevskaya st. 49, Moscow, 127550, Russia

*e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

The effect of different organic compounds (glucose, fructose, ribose, glycine, alanine, pyruvate, acetate, citrate and yeast extract) as well as of the wastes of food production (molasses, stillage, sweet whey) on the growth of iron-oxidizing acidophilic microorganisms and biooxidation of ferrous iron was studied. Representatives of the microorganisms predominating in biohydrometallurgical processes: archaea of the family Ferroplasmaceae (*Acidiplasma aeolicum* V1^T, *A. cupricumulans* BH2^T, *Acidiplasma* sp. MBA-1, *Ferroplasma acidiphilum* B-1) and bacteria of the genus *Sulfobacillus* (*S. thermosulfidooxidans* SH 10-1, *S. thermotolerans* Kr1^T) were the subjects of the study. All studied strains most actively grew and oxidized ferrous iron in the presence of yeast extract, which is probably due to the presence of the large number of different growth factors in its composition, while others substrates provided growth of microorganisms and ferrous iron oxidation.

Keywords: acidophilic microorganisms, biohydrometallurgy, *Sulfobacillus*, *Ferroplasmaceae*, mixotrophy, iron-oxidizing microorganisms

Сведения об авторах

Булаев Александр Генрихович – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-59-65; e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Ерофеева Таисия Владимировна – студент кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-63; e-mail: taisiyar@yandex.ru

Воробьева Ксения Сергеевна – студент кафедры защиты растений факультета агрономии и биотехнологии РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-976-04-80; e-mail: yev.evsevia@yandex.ru

Челидзе Георгий Гарриевич – студент кафедры защиты растений факультета агрономии и биотехнологии РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-976-04-80; e-mail: winnyduff@gmail.com

Рамонова Алла Аликовна – науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-12-56; e-mail: a.ramonova@yandex.ru