

**Хомченкова Анастасия Сергеевна**

Выпускница биологического факультета Челябинского государственного университета (специальность – «Микробиология»). С 2015 г. работает в Научно-исследовательском геотехнологическом центре ДВО РАН в должности младшего научного сотрудника научно-исследовательского отдела. В 2016 г. поступила в аспирантуру НИГТЦ по направлению «Науки о Земле». Под руководством д.г.-м.н., проф. Ю.П. Трухина проводит исследования влияния тяжелых металлов на сообщества кислотофильных хемолитотрофных микроорганизмов. По теме исследования опубликовано 4 работы. Является заместителем председателя Совета молодых ученых НИГТЦ ДВО РАН.

УДК 550.72 + 579.66

DOI: 10.25808/08697698.2018.202.6.017

А.С. ХОМЧЕНКОВА

## Окислительная активность культуры кислотофильных хемолитотрофов, адаптированных к высокой концентрации никеля

*Проведена адаптация смешанной культуры кислотофильных хемолитотрофных микроорганизмов к высоким концентрациям ионов никеля в питательной среде (12, 14, 16, 18, 20 г/л). Рост клеток культуры сохранялся во всех вариантах концентраций Ni. Для исследования окислительной активности выбрана культура, адаптированная к 20 г/л ионов никеля. Скорость окисления железа адаптированной культурой была приблизительно в 2 раза выше, чем контрольной.*

*Ключевые слова:* хемолитотрофные микроорганизмы, никель, окисление железа, устойчивость, бактериально-химическое выщелачивание, сульфидные руды.

**The oxidation activity of acidophilic chemolithotrophic culture, adapted to a high nickel concentration.**  
A.S. KHOMCHENKOVA (Scientific Research Geotechnological Center, FEB RAS, Petropavlovsk-Kamchatsky).

*The acidophilic chemolithotrophic microorganisms mixed culture's adaptation to high concentrations of nickel ions in nutrient medium (12, 14, 16, 18, 20 g/l) was carried out. A culture cell's growth was saved with all concentration variants. Culture adapted to 20 g/l Ni ions was chosen to research oxidizing activity. The ferrous oxidation rate with adapted culture was about twice as high than the control one.*

*Key words:* chemolithotrophic microorganisms, nickel, ferrous oxidation, resistance, bacterial-chemical leaching, sulphide ores.

---

ХОМЧЕНКОВА Анастасия Сергеевна – аспирант, младший научный сотрудник (Научно-исследовательский геотехнологический центр ДВО РАН, Петропавловск-Камчатский). E-mail: bioleaching@yandex.ru

Бактериально-химическое выщелачивание (БХВ) обладает рядом преимуществ по сравнению с другими, не биоготехнологичными, методами переработки сульфидного минерального сырья [4]. Своими выгодными для промышленности характеристиками – например, такими, как экологическая безопасность (за счет малого количества отходов), финансовая экономичность (за счет простой организации процесса), – БХВ сульфидных руд обязано участию кислотолюбивых хемолитотрофных микроорганизмов, а именно их окислительной активности.

Сочетание биологического (прямого) и химического (косвенного) пути окисления сульфидных минералов – основа БХВ. Для биологического пути характерен контакт клеток микроорганизмов и поверхности минерала (преимущественно в дефектных участках кристаллической решетки); процесс проходит в несколько стадий при участии ферментов.

Схема реакции:



Химический путь реализуется за счет выработки окислителя клетками микроорганизмов. Пример реакции, протекающей в кислых растворах; здесь окислителем является  $\text{Fe}^{3+}$ :



где  $\text{Me}_n\text{S}_m$  – сульфид металла [2].

Природные сообщества микроорганизмов рудных месторождений, в том числе биотехнологически важные роды (*Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, *Sulfolobus*, *Sulfobacillus*, *Acidianus*), приспособились к повышенным содержаниям тяжелых металлов (например, никель, медь, кобальт). Их клетки обладают одним или сразу несколькими механизмами устойчивости: внеклеточный барьер; активный транспорт ионов металлов из клетки (эффлюкс); внеклеточная секвестрация; внутриклеточная секвестрация; восстановление ионов металлов [8]. Однако подавляющие концентрации способны привести к резкому снижению биопотенциала сообщества микроорганизмов [3]. В условиях чанового БХВ концентрации тяжелых металлов могут значительно превышать природные и ингибировать жизнедеятельность клеток, т.е. угнетать их рост и снижать окислительную активность [7].

Для создания эффективного микробного сообщества – участника технологии БХВ необходимо изучать пределы толерантности кислотолюбивых хемолитотрофов к тяжелым металлам, их окислительную активность в присутствии тяжелых металлов в среде культивирования.

В данной статье описан эксперимент, задачами которого являлись: адаптация сообщества микроорганизмов окисленной сульфидной кобальт-медно-никелевой руды (в составе культуры идентифицированы *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Sulfobacillus* spp.) к высоким концентрациям ионов никеля (12, 14, 16, 18, 20 г/л Ni) в питательной среде 9К с железом; исследование окислительной активности уже адаптированной культуры в отношении  $\text{Fe}^{2+}$ .

Способность окислять железо является главным полезным для человека фактором биологической активности кислотолюбивых хемолитотрофов. Культура микроорганизмов, не утратившая такой способности в процессе адаптации к высоким содержаниям токсичных металлов в культуральной среде в условиях лаборатории, более перспективна как биокomпонент БХВ в промышленных условиях.

## Материалы и методы

В эксперименте использована смешанная культура мезофильных кислотолюбивых хемолитотрофных микроорганизмов, предварительно культивированная на среде 9К. По данным ПЦР-диагностики НИГТЦ ДВО РАН (2009 г.) в составе культуры

идентифицированы *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Sulfobacillus* spp. – качественный анализ. Источник культуры: окисленная руда месторождения Шануч, Камчатский край\* [5].

Количественный учет клеток (всей культуры) проводили прямым подсчетом под микроскопом в 10 полях зрения. Количество клеток в 1 мл среды рассчитывали по формуле

$$X = N_m \cdot 7,56 \cdot 10^6, \quad (3)$$

где  $X$  – число клеток в 1 мл,  $N_m$  – среднее арифметическое число в  $m$  полях зрения,  $7,56 \cdot 10^6$  – коэффициент, рассчитанный с учетом объема анализируемой пробы (2 мкл), площади покровного стекла ( $576 \text{ мм}^2$ ) и площади поля зрения ( $0,0132 \text{ мм}^2$ ).

Данный метод учета количества клеток выбран ввиду его доступности. Метод не позволяет визуально различить клетки *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Sulfobacillus* spp.; поле зрения микроскопа заполняли морфологически идентичные подвижные одиночные полупрозрачные палочки. Подсчет клеток каждого отдельного вида, составляющего культуру, не проводили, так как для данного эксперимента численность видов и их соотношение не имели значения.

Окислительную активность культуры исследовали путем определения концентраций  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  в растворах питательной среды 9К (где изначальная концентрация  $\text{Fe}^{2+}$  была равна 9 г/л) методом трилонометрического титрования трилоном Б (стандарт-титр ТУ 2642-001-23164744-2016). Методика определения  $\text{Fe}^{3+}$ : в коническую колбу объемом 100 мл приливали 30 мл индикаторного раствора (смесь 20%-й сульфосалициловой кислоты и 20%-й соляной кислоты в дистиллированной воде) и вносили 1 мл анализируемой среды; нагревали до  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  на плитке и титровали раствором трилона Б до перехода окраски из красно-фиолетовой в лимонно-желтую. В конце титрования, после добавления одной избыточной капли, раствор становился бесцветным (1 капля =  $0,015 \text{ мл}$ ). Концентрацию  $\text{Fe}^{3+}$  (г/л) вычисляли по формуле

$$C_{\text{Fe}^{3+}} = (V_{\text{ТБ}} \cdot (0,025 \cdot 55,84) \cdot 1000) : V_{\text{пробы}},$$

где  $V_{\text{ТБ}}$  – количество израсходованного на титрование раствора трилона Б, мл;  $0,025$  – молярность трилона Б;  $55,84$  – атомная масса Fe.

Методика определения  $\text{Fe}^{2+}$ : раствор, в котором оттитровано трехвалентное железо, вновь нагревали до  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ , добавляли 50 мг пероксодисульфата аммония (надсернистого аммония), кипятили в течение 1 мин. Раствор изменял окраску на красно-фиолетовую, после чего его вновь титровали раствором трилона Б до перехода окраски в лимонно-желтую. В конце титрования после добавления одной избыточной капли раствор становился бесцветным. Добавляли несколько кристаллов надсернистого аммония для проверки полноты окисления (стабильность окраски). Концентрацию  $\text{Fe}^{2+}$  вычисляли по той же формуле, что и концентрацию  $\text{Fe}^{3+}$ .

#### **Адаптация к высоким концентрациям ионов никеля**

Для создания условий высоких концентраций ионов никеля использовали питательную минеральную основу 9К с  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (концентрация  $\text{Fe}^{2+} = 9 \text{ г/л}$ ) [1] с добавлением  $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Был получен ряд концентраций: 12, 14, 16, 18, 20 г/л Ni. В раннем эксперименте [6] использовались более низкие концентрации металлов, чем в описываемом, при этом культура сохраняла рост, но окислительная активность в отношении  $\text{Fe}^{2+}$  не была исследована. В данном же эксперименте решено было исследовать окислительную активность культуры в условиях экстремально высоких концентраций Ni.

---

\* Отчет о научно-исследовательской работе по теме (проекту) № 0283-2016-0002 Исследование бактериально-химических процессов и создание основ геобиотехнологии переработки сульфидных медно-никелевых руд и концентратов с получением конечных продуктов, приложение, паспорт культуры микроорганизмов № 1 (НИГТЦ ДВО РАН, Петропавловск-Камчатский, 2017 г.).

В колбы Эрленмейера объемом 250 мл, где была питательная среда (с) с указанными выше концентрациями ионов никеля, произвели посев культуры (к) ( $N_{\text{кл.}} = 1,2 \cdot 10^8$  кл./мл – общая численность клеток культуры, соотношение *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Sulfobacillus* spp. установлено не было) в соотношении к : с = 1 : 10 (10 мл культуры и 100 мл среды). В том же соотношении культура была внесена в контрольную колбу (К), где содержалась «чистая» (без ионов никеля) 9К; рН всех сред – 1,6, наиболее благоприятный для роста исследуемой смешанной культуры, достигался путем добавления 10 Н серной кислоты в состав питательной среды 9К.

Для активизации процесса роста клеток культуры в первые 5 сут адаптируемые образцы культивировали в термостате (29 °С), для аэрации среды колбы были помещены на качалку ( $\approx 110$  об/мин). Затем в течение 10 сут культивировали статично (без перемешивания) при комнатной температуре. В течение всего периода культивирования рН в образцах сохранялся на уровне 1,6–1,8.

### **Окислительная активность культуры в отношении $Fe^{2+}$**

Для исследования окислительной активности был выбран образец культуры, адаптированный к 20 г/л ионов никеля. На момент окончания адаптации и пересева культуры в «чистую» питательную среду 9К количество клеток в ней составляло  $5,6 \cdot 10^7$  кл./мл (общая численность клеток культуры). Источник железа в среде –  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (концентрация  $Fe^{2+} = 9$  г/л). В колбы Эрленмейера объемом 250 мл произвели посев в соотношении к : с = 1 : 10 (10 мл культуры и 100 мл среды) в трех повторениях (Ni I, Ni II, Ni III – шифры адаптированных образцов).

Культивировали в течение 7 сут в термостате (29 °С), аэрацию среды осуществляли перемешиванием на качалке ( $\approx 110$  об/мин) в 0–3-и, 6–7-е сутки эксперимента.

## **Результаты и обсуждение**

### **Адаптация к высоким концентрациям ионов никеля**

Ни одна из указанных концентраций ионов Ni не привела к угнетению окислительной активности исследуемой культуры в отношении  $Fe^{2+}$  – главной ее биологической активности, что подтверждает наличие природных механизмов резистентности у микроорганизмов-представителей.

Рост клеток культуры в период адаптации к высоким концентрациям ионов никеля в питательной среде ингибировался только в первые сутки культивирования, это видно из сравнения с контрольным образцом (табл. 1). Уже к третьим суткам численность клеток в адаптируемых образцах превосходила численность в контрольном образце.

Для дальнейшего хода исследования (наблюдения за окислительной активностью в отношении  $Fe^{2+}$ ) был выбран образец культуры, адаптированный к 20 г/л ионов Ni, как устойчивый к самой высокой заявленной концентрации.

Таблица 1

**Численность клеток культуры в период адаптации к высоким концентрациям ионов никеля в питательной среде**

Концентрация ионов Ni, г/л	Кол-во клеток, $\cdot 10^7$ кл./мл		
	1-е сутки	3-и сутки	10-е сутки
К (0)	2,1	4,2	4,8
12	1,0	5,0	6,1
14	1,4	4,6	6,4
16	0,8	5,0	5,9
18	0,8	7,9	7,3
20	0,4	3,1	5,6

## Окислительная активность культуры

Рост адаптированной культуры в «чистой» (без ионов никеля) питательной среде происходил медленнее, чем рост клеток в контроле, однако к третьим суткам эксперимента численность клеток превышала контрольные показатели более чем в 2 раза. В последующие сутки количество клеток адаптированной культуры оставалось почти постоянным, в контроле повышалось (табл. 2).

Результаты измерений концентраций  $Fe^{3+}$  и  $Fe^{2+}$  представлены в табл. 3 и на рис. 1 и 2 соответственно. Можно видеть, что адаптированная культура окисляет железо интенсивнее, чем контрольная, – вероятно, это связано с более быстрым ростом численности клеток первой (вторые–третьи сутки эксперимента). Однако даже при сохранении численности клеток примерно на одном уровне в третьи–седьмые сутки эксперимента окисление железа адаптированной культурой

Таблица 2

Численность клеток адаптированной культуры в «чистой» питательной среде

Сутки	Кол-во клеток, $\cdot 10^7$ кл./мл			
	К	Ni I	Ni II	Ni III
1	0,68	0,27	0,3	0,3
2	0,50	0,45	0,45	0,45
3	0,84	2,49	2,65	2,73
6	1,74	2,74	2,58	2,81
7	4,02	2,65	2,71	2,27

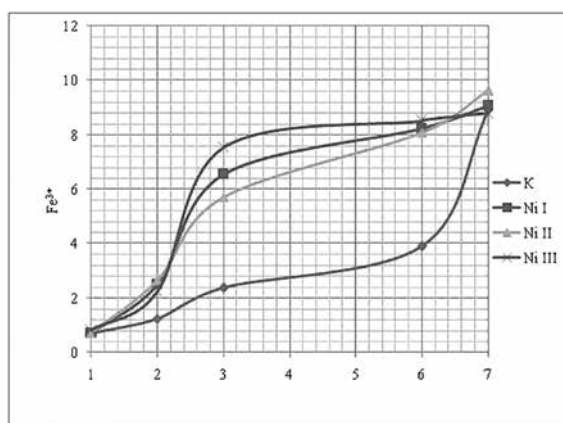


Рис. 1. Изменения концентрации  $Fe^{3+}$  в питательной среде с адаптированной культурой в сравнении с контролем. Здесь и на рис. 2 по оси абсцисс – продолжительность эксперимента, сут

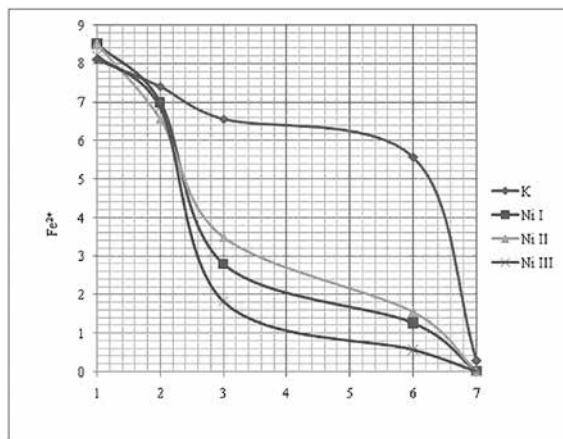


Рис. 2. Изменения концентрации  $Fe^{2+}$  в питательной среде с адаптированной культурой в сравнении с контролем

протекает быстрее, нежели контрольной, в которой количество клеток постоянно возрастало. Необходимо отметить, что почти все железо питательного раствора ( $Fe^{2+}$ ) было окислено (до  $Fe^{3+}$ ) адаптированной культурой и контрольным образцом к седьмым суткам эксперимента.

Таблица 3

**Изменения концентраций  $Fe^{3+}$  и  $Fe^{2+}$  в «чистой» питательной среде с адаптированной культурой в сравнении с контролем**

Сутки	Концентрация $Fe^{3+}$ , г/л				Концентрация $Fe^{2+}$ , г/л			
	К	Ni I	Ni II	Ni III	К	Ni I	Ni II	Ni III
1	0,7	0,7	0,7	0,8	8,1	8,5	8,5	8,2
2	1,25	2,51	2,65	2,23	7,4	6,98	6,56	6,84
3	2,37	2,37	5,72	7,54	6,56	2,8	3,49	1,81
6	3,9	3,9	8,09	8,52	5,58	1,26	1,54	0,56
7	8,93	8,93	9,63	8,79	0,28	0	0	0

### Заклучение

Результаты эксперимента позволяют сделать вывод о том, что исследованная культура мезофильных ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов способна адаптироваться к высоким концентрациям ионов никеля в питательной среде и оставаться биологически активной. Клетки культуры имеют природные механизмы резистентности к воздействию тяжелых металлов. Окислительная активность культуры не была утрачена или ослаблена в период адаптации, напротив, такая культура интенсивно окисляла  $Fe^{2+}$ .

Представляются интересными дальнейшие исследования, связанные с определением биотехнологического потенциала адаптированной культуры (использование культуры в качестве биологического компонента чанового БХВ).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Каравайко Г.И., Росси Дж., Агате А., Грудев С., Авакян З.А. Биоготехнология металлов: практическое руководство. М., 1989. 375 с.
2. Кузякина Т.И., Хайнасова Т.С., Левенец О.О. Биотехнология извлечения металлов из сульфидных руд // Вестн. Камчатской региональной ассоциации «Учебно-научный центр». 2008. № 2, вып. 12. С. 76–86.
3. Сизенцов А.Н., Нугаманова Э.М., Пешков С.А. Влияние тяжелых металлов на рост пробиотических штаммов *E. coli* M-17, *E. faecium*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* LB-51 и бактерии рода *Bacillus* в условиях *in vitro* // Вестн. ОГУ. 2011. № 12 (131). С. 358–360.
4. Хайнасова Т.С., Левенец О.О. Бактериально-химическое выщелачивание как экологически безопасный способ переработки сульфидной кобальт-медно-никелевой руды // Разведка и охрана недр: науч.-техн. журн. (ФГУП ВИМС). 2015. № 1. С. 49–54.
5. Хайнасова Т.С., Рогатых С.В., Кузякина Т.И., Корнилова Т.И. Окисленная руда как источник выделения ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов для биовыщелачивания сульфидных медно-никелевых руд // Горный информ.-аналит. бюл. 2013. № 10. С. 135–138.
6. Хомченкова А.С. Совокупное воздействие никеля и кобальта на рост культуры ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов // Горный информ.-аналит. бюл. Спец. выпуск № 32 «Камчатка-5». М.: Горная книга, 2017. № 12. С. 222–227.
7. Хомченкова А.С. Тяжелые металлы и выщелачивающие микроорганизмы (обзор) // Горный информ.-аналит. бюл. Спец. выпуск № 32 «Камчатка-5». М.: Горная книга, 2017. № 12. С. 228–236.
8. Янева О.Д. Механизмы устойчивости бактерий к ионам тяжелых металлов // Микробиол. журн. 2009. Т. 71, № 6. С. 54–65.