

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 579.222.4

НОВЫЙ ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ РОДА *SALISEDIMINIBACTERIUM*, СПОСОБНЫЙ ЭФФЕКТИВНО ВОССТАНАВЛИВАТЬ ХРОМАТ

© 2024 г. А. В. Игнатенко^а, Т. В. Хижняк^{а, *}

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: khijniaktv@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После исправления 24.10.2023 г.

Принята к опубликованию 26.10.2023 г.

Выделенный новый галоалкалофильный представитель рода *Salisediminibacterium* семейства *Bacillaceae* обладает высокой хромат-восстанавливающей активностью в широком диапазоне условий. Эффективность восстановления достигает более 99% при начальной концентрации 15 мг Cr(VI)/л на минеральных средах и в органических средах при начальной концентрации 100 мг Cr(VI)/л за 3 сут. Показано влияние органического вещества на скорость восстановления хромата. Выделенный штамм MB1000 отличается по физиологическим особенностям от описанных ранее представителей рода *Salisediminibacterium*.

Ключевые слова: биоредукция хроматов, *Salisediminibacterium*, щелочные, соленые среды

DOI: 10.31857/S0026365624020091

Хром — ценный поливалентный металл. Основным источником хрома в природе являются ультраосновные магматические породы. Известно порядка 40 хромосодержащих минералов (Николаев и соавт., 2021). В природе стабильными являются трех- и шестивалентные формы хрома (Cr(III) и Cr(VI), соответственно). Соединения Cr(III) малорастворимы и представлены в форме малоподвижного гидроксида (Liang et al., 2021), напротив, шестивалентный хром представлен преимущественно в форме подвижного аниона CrO_4^{2-} (Водяницкий, 2009, Bartlett, 1991). Канцерогенный и мутагенный эффект Cr(VI) объясняется его высокой подвижностью и реакционной способностью (Pushkar et al., 2021). По некоторым оценкам, токсичность Cr(VI) в 100–1000 раз выше, чем у Cr(III) (Dhal et al., 2013).

Основными производителями обогащенного феррохрома являются Южная Африка, Индия, Казахстан, Китай, Турция; на их долю приходится более 80% мировой добычи хромовой руды (Высоцкий, 2006). Широкое использование хрома в металлургической, кожевенной и химической промышленности сопряжено с образованием различных отходов. Годовой выброс хромосодержащих отходов достигает в Европе — 420×10^3 , Азии — 370×10^3 и в Северной Америке — 290×10^3 т Cr/год (Водяницкий, 2009). Большинство методов очистки отходов основаны на реакции восстановления

Cr(VI) до Cr(III) с последующим осаждением с щелочами. Однако существующие химические и электрохимические методы очистки эффективны только в условиях высоких концентраций хрома, дорогостоящи и требуют повышенного внимания к образующимся продуктам очистки (Barrera-Diaz et al., 2012). Методы биоочистки являются перспективным направлением (Pradhan et al., 2017). Способность к восстановлению хроматов отмечается преимущественно у *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* (Huang et al., 2017). Большинство исследований охватывают условия pH, близкие к нейтральным, и с малой соленостью. Поиск организмов, способных проводить реакцию восстановления Cr(VI) в щелочных соленых условиях, характерных для гальванических и кожевенных производств, является актуальной задачей на сегодняшний день.

В настоящей работе представлены результаты исследования фенотипических свойств, таксономического положения и особенностей восстановления токсичного хромата штамма *Salisediminibacterium* MB1000.

Штамм MB1000 новой галоалкалофильной хроматредуцирующей бактерии был выделен из накопительной культуры нитратредуцирующих бактерий, инокулятом служили осадки содовых озер Кулундинской степи на минеральной среде с нитратом в аэробных условиях. Последующее разделение

культур проводили в анаэробных условиях методом предельных разведений на жидкой модифицированной среде ЛБ* состава (г/л): Na_2CO_3 — 6.5; NaHCO_3 — 2; NaCl — 25; K_2HPO_4 — 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.1; NH_4Cl — 0.1; дрожжевой экстракт — 0.1; среда LB BD (USA) — 15; K_2CrO_4 — 3.8; ацетат натрия — 1. Далее штамм MB1000 поддерживали на минеральной среде без нитрата в аэробных условиях в среде состава (г/л): Na_2CO_3 — 13; NaHCO_3 — 4; NaCl — 50; K_2HPO_4 — 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.1; NH_4Cl — 0.1; дрожжевой экстракт — 0.1; ацетат натрия — 1.

Для определения филогенетического положения штамма MB1000 было проведено частичное секвенирование гена 16S рРНК (ЦКП “Биоинженерия”, ФИЦ Биотехнологии РАН) с универсальными праймерами 11f и 357f. Анализ полученной последовательности (933 п.н.) проведен в базе данных NCBI. Последовательность выделенного штамма была выровнена с соответствующими последовательностями ближайших видов с помощью программы Mafft v.7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>). Построение филогенетического древа реализовано в программе MegaB.

Световую микроскопию с фазовым контрастом проводили на микроскопе Olimpus BX41, оборудованном фотоаппаратурой. Электронную микроскопию проводили на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1400 (“Jeol”, Япония) с приставкой для рентгеновского микроанализа.

Количество биомассы определяли, измеряя оптическую плотность раствора при длине волны 600 нм на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometr basic.

Определение концентрации Cr(III) в формирующемся в процессе культивирования осадке определяли путем растворения осадка в 2н HCl с образованием окрашенных комплексов общей формулой $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]\text{Cl}_3$. Светопоглощение измеряли при длине волны 580 нм.

Определение концентрации Cr(VI) проводили дифенилкарбазидным методом (Лаврухина, Юкина, 1979) с изменениями (Шаповалова и соавт., 2009).

Эксперимент по установлению предельно допустимой концентрации хрома проводили на минеральных средах стандартного состава с разным количеством дрожжевого экстракта (50, 500 и 2500 мг/л) и концентрацией хрома — 15, 30, 70 и 120 мг Cr(VI)/л. На среде ЛБ* проверена возможность восстановления Cr(VI) в аэробных и анаэробных условиях с добавлением 100, 500 и 2000 мг Cr(VI)/л. В аэробном эксперименте посев проводили в пенициллиновые флаконы на 20 мл под ватную пробку. Анаэробные условия создавали путем вакуумирования и продувки аргоном пенициллиновых флаконов на 20 мл, герметично закрытых резиновыми пробками.

Мультисубстратное тестирование с использованием различных органических доноров электронов проведено анаэробно для лактата, ацетата,

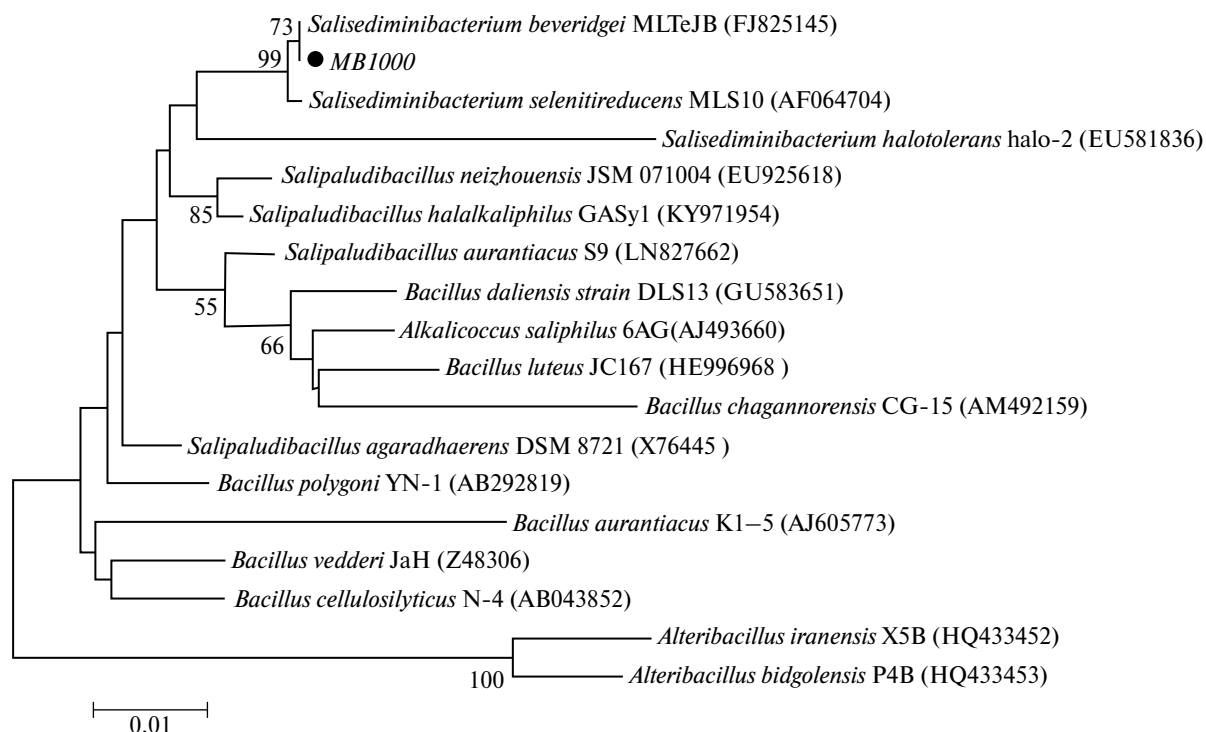


Рис. 1. Положение штамма MB1000 на филогенетическом древе представителей семейства *Bacilliaceae*. Филогенетическое древо построено методом ближайших соседей (Neighbour-Joining) с использованием бутстреп-анализа на 100 альтернативных филогенетических деревьев. Значения бутстреп-анализа меньше 50% скрыты.

сахарозы и глицерина, в концентрации 1 г/л на минеральной среде. Исходная концентрация Cr(VI) — 50 мг/л. Также возможность восстановления была проверена для следующих анионов — нитрата, ванадата, селенита и хромата на минеральной среде в анаэробных условиях с ацетатом (1 г/л). Исходная концентрация нитрата — 1 г/л. Для остальных металлов концентрация — 50 мг Ме/л. Объем среды во всех экспериментах составлял 10 мл. Объем посевного материала, предварительно культивированного 2–4 сут на минеральной среде — 0.1 мл. Культивирование проводили при 30°C в статичных условиях. Все эксперименты выполнены в 3-х кратной повторности. В качестве контроля использовали среды со всеми добавками без бактерий (химический контроль) или с бактериями, но без донора/акцептора электронов (биологический контроль).

Клетки выделенного штамма MB1000 подвижные, имеют палочковидную форму (0.5–0.6 × × 2.3–2.7 мкм), в присутствии хромата в среде образуют биопленку. Проведенный филогенетический анализ показал, что штамм MB1000 относится к роду *Salisediminibacterium* семейства *Bacillaceae*. Согласно результатам сравнения нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК с базой данных NCBI Blast, наибольший уровень сходства на основании нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК установлен с *Salisediminibacterium beveridgei* (сходство нуклеотидной последовательности 99.46%) (Baesman et al., 2009) и *Salisediminibacterium selenitireducens* 98.71% (Blum et al., 1998) (рис. 1).

Культивирование на минеральных средах с различным содержанием дрожжевого экстракта и Cr(VI) в анаэробных условиях показало, что с увеличением концентрации органического вещества в среде увеличивается скорость и эффективность процесса восстановления хроматов. Также увеличивается значение максимальной концентрации Cr(VI) в среде, при которой идет активный рост штамма MB1000. Так, на минеральной среде, содержащей 100 мг дрожжевого экстракта, штамм

MB1000 восстанавливал до 99.9% от исходных 15 мг Cr(VI)/л и до 37.5, 30.4 и 7.9% от исходных 30, 70 и 120 мг Cr(VI)/л за 3 сут. В то же время, при концентрации дрожжевого экстракта 2500 мг/л выделенный штамм восстанавливает до 87.7, 99.9, 99.4 и 74.9% Cr(VI) от исходных 15, 30, 70 и 120 мг Cr(VI)/л за 3 сут, соответственно. На среде, содержащей 500 мг дрожжевого экстракта, получены промежуточные значения восстановительной активности.

При сравнении роста и восстановительной активности штамма MB1000 на среде ЛБ* в аэробных и в анаэробных условиях показано, что при начальной концентрации 100 и 500 мг Cr(VI)/л за 3 сут восстанавливается до 99.7 и 20.8% Cr(VI) в анаэробных условиях и до 98.4 и 47.7% в аэробных, соответственно. При начальной концентрации 2000 мг Cr(VI)/л за 2 месяца культивирования восстанавливается 14.9% Cr(VI) в анаэробных условиях и 79.5% в аэробных.

В результате мультисубстратного тестирования показана возможность роста штамма MB1000 на лактате, ацетате, сахарозе и глицерине в качестве единственного донора электрона и хромате в качестве акцептора. При этом восстанавливается до 50.3, 32.1, 99.8, 56.4% от исходных 50 мг Cr(VI)/л в минеральной среде в анаэробных условиях. В анаэробных условиях штамм MB1000 способен использовать в качестве акцептора электронов, помимо хромата, также ванадат, нитрат и селенит в присутствии ацетата.

В процессе культивирования штамма MB1000 на средах с хромом на дне пенициллиновых флаконов накапливается органоминеральный осадок серо-фиолетового цвета. Последовательное 4-х кратное низкоскоростное центрифугирование (200 g, 5–10 с) позволяет частично разделить осадок на компоненты: биомассу (остающуюся во взвешенном состоянии) и минеральный осадок. Результаты рентгеновского микроанализа показывают значительное содержание хрома в минеральной фракции осадка (рис 2.).

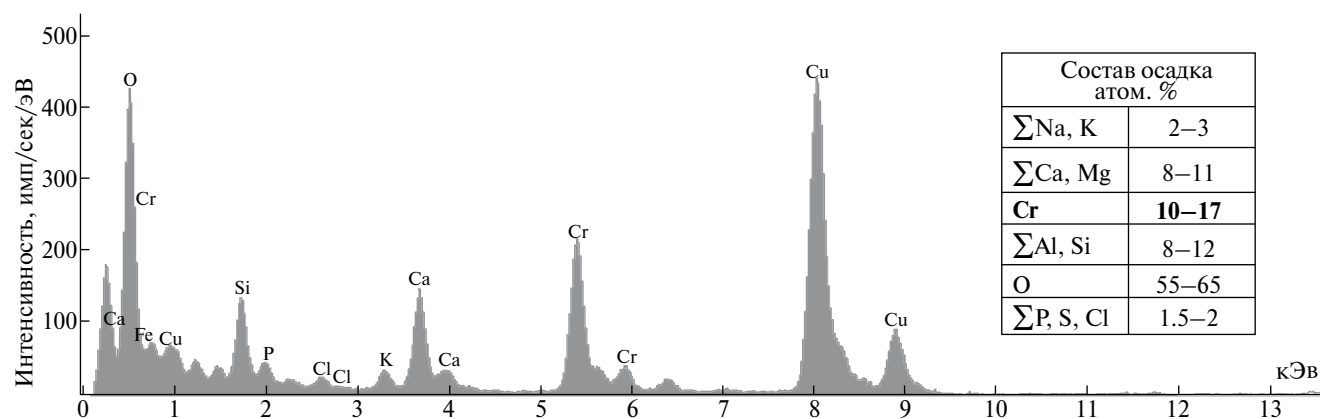


Рис. 2. Рентгеновский микроанализ минерального осадка.

При растворении этого осадка в 2н HCl образуется окрашенный голубовато-зеленый раствор. Спектрофотометрический анализ показывает, что полученный раствор имеет максимумы поглощения при длине волны 324, 418 и 528 нм. Пики при 418 и 528 нм соответствуют максимумам поглощения химически чистого раствора $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, что подтверждает локализацию восстановленного Cr(III) в минеральной фракции образующегося осадка.

Таким образом, выделенный из щелочных осадков штамм MB1000 является факультативно анаэробным галоалкалофильным хемогетеротрофом. Ранее описанные представители рода *Salisediminibacterium* были выделены из осадков щелочных водоемов — *S. selenitireducens* MLS10 и *S. beveridgei* MLTejB из Mono Lake (США), *S. haloalcalitolerans* halo-2 из Xiarinaoer lake (Китай), *S. haloalcalitolerans* 10nlg Lonar lake (Индия) и 7 штаммов *S. locisalis* из содовых озер Chagannor (Китай), Natron (Танзания), Elmenteita (Кения) (Márquez et al., 2011; Gupta et al., 2020). Специфической особенностью штамма MB1000 является рост на хромате в анаэробных условиях на солевых щелочных минеральных и органических средах. Штамм *S. beveridgei* MLTejB на хромате не растет, а в случае остальных штаммов это свойство не проверялось. Таким образом, эта способность впервые выявлена у представителей рода *Salisediminibacterium*. Штамм MB1000 способен расти на нитрате (как и *S. selenitireducens*, *S. beveridgei*, *S. haloalcalitolerans*), селените (как и *S. selenitireducens*, *S. beveridgei*) и ванадате (для всех остальных не проверялось). Полученные результаты дают предпосылки к использованию выделенного организма для биоочистки сточных вод гальванических и некоторых химических производств в условиях высокой щелочности, солёности и сложного непостоянного состава среды.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Водяницкий Ю.Н. Тяжелые и сверхтяжелые металлы и металлоиды в загрязненных почвах. М.: ГНУ Почвенный институт им. В.В. Докучаева Россельхозакадемии, 2009. 95 с.
- Высоцкий Э.А., Губин В.Н., Илькевич Г.И., Штефан Л.В. Геология металлических полезных ископаемых: учебное пособие для студентов вузов. Минск: ТетраСистемс, 2006. 336 с.
- Лаврухина А.К., Юкина Л.В. Аналитическая химия хрома. М.: Наука, 1979. 219 с.
- Николаев В.И., Казеннова А.Д., Никольская Н.Е., Сергеев Н.С., Самков В.С., Долгушин С.С., Сержантов Н.Ф. Хромитоносные провинции и месторождения хромовых руд России // Минеральное сырье. 2021. № 43. М.: ВИМС, 2021. С. 185.
- Шаповалова А.А., Хижняк Т.В., Турова Т.П., Сорокин Д.Ю. Новая денитрифицирующая факультативно галоалкалофильная бактерия *Halomonas chromatireducens* sp. nov. из содовых солончаков, способная к аэробному восстановлению хромата // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 117–127.
- Baerman S.M., Stolz J.F., Kulp T.R., Oremland R.S. Enrichment and isolation of *Bacillus beveridgei* sp. nov., a facultative anaerobic haloalkaliphile from Mono Lake, California, that respire oxyanions of tellurium, selenium, and arsenic // Extremophiles. 2009. V. 13. P. 695–705.
- Barrera-Diaz C.E., Lugo-Lugo V., Bilyeu B. A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr(VI) reduction // J. Hazard. Mater. 2012. V. 223–224. P. 1–12.
- Bartlett R.J. Chromium cycling in soils and water: links, gaps, and methods // Environ. Health Perspect. 1991. V. 92. P. 17–24.
- Blum J.S., Bindi A.B., Buzzelli J., Stolz J.F., Oremland R.S. *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic // Arch. Microbiol. 1998. V. 171. P. 19–30.
- Dhal B., Thatoi H.N., Das N.N., Pandey B.D. Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: a review // J. Hazard. Mater. 2013. V. 250–251. P. 272–291.
- Gupta R.S., Patel S., Saini N., Chen S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 5753–5798.
- Huang Y., Feng H., Lu H., Zeng Y. A thorough survey for Cr-resistant and/or — reducing bacteria identified comprehensive and pivotal taxa // In. Biodeter. Biodegr. 2017. V. 117. P. 22–30.

- Liang J., Huang X., Yan J., Li Y., Zhao Z., Liu Y., Ye J., Wei Y. A review of the formation of Cr(VI) via Cr(III) oxidation in soils and groundwater // Sci. Total Environ. 2021. V. 774. Art. 145762.
- Márquez M.C., Carrasco I.J., de la Haba R.R., Jones B.E., Grant W.D., Ventosa A. *Bacillus locisalis* sp. nov., a new haloalkaliphilic species from hypersaline and alkaline lakes of China, Kenya and Tanzania // Syst. Appl. Microbiol. 2011. V. 34. P. 424–428.
- Pushkar B., Sevak P., Parab S., Nilkanth N. Chromium pollution and its bioremediation mechanisms in bacteria: a review // J. Environ. Manage. 2021. V. 287. Art. 112279.

SHORT COMMUNICATIONS

A New Haloalkaliphilic Member of the Genus *Salisediminibacterium* Capable of Efficient Chromate Oxidation

A. V. Ignatenko¹, and T. V. Khijniak¹, *

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: khijniaktv@yandex.ru

Received October 13, 2023; revised October 24, 2023; accepted October 26, 2023

Abstract—A new haloalkaliphilic member of the genus *Salisediminibacterium* (family *Bacillaceae*) with high chromate-reducing activity in a broad range of conditions was isolated. Reduction efficiency after 3 days was up to 99% at initial Cr(VI) concentrations 15 and 100 mg/L for mineral and organic media, respectively. Effect of organic matter on the rate of chromate reduction was shown. The isolate MB1000 differed from the presently described members of the genus *Salisediminibacterium* in its physiological characteristics.

Keywords: chromate bioreduction, *Salisediminibacterium*, alkaline and saline media