

УДК 579.26;579.8

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В БИОРЕМЕДИАЦИИ ОТ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И МЕТАЛЛОИДОВ (ОБЗОР)

© 2023 г. А. Л. Брюханов¹, Т. В. Хижняк², *

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

²Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: tanya_khijniak@mail.ru

Поступила в редакцию 02.08.2022 г.

После доработки 01.09.2022 г.

Принята к публикации 10.09.2022 г.

Загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами, металлоидами и радионуклидами представляет собой проблему мирового значения, в значительной степени влияющую на состояние биосферы. В частности, соединения хрома обладают токсичным, мутагенным и канцерогенным действием. Основной принцип очистки антропогенных и природных экосистем от хроматов — восстановление Cr(VI) до Cr(III), соли которого существенно менее токсичные и нерастворимые. Однако используемые в настоящее время электрохимические и ионообменные методы очистки достаточно дороги и требуют применения специальных реагентов. В то же время, особый интерес для биоремедиации представляют сульфатредуцирующие бактерии (СРБ), поскольку многие из них весьма устойчивы к высоким концентрациям тяжелых металлов и способны эффективно восстанавливать их в присутствии водорода как донора электронов. В обзоре суммированы сведения о взаимодействии тяжелых металлов, металлоидов и радионуклидов с клетками СРБ. Рассматриваются особенности метаболизма этих микроорганизмов, приводящие к внутриклеточной аккумуляции тяжелых металлов и металлоидов, сложные и тонко регулируемые ферментативные механизмы восстановления токсичных металлов (с использованием различных цитохромов, гидрогеназ, оксидоредуктаз, узкоспецифичных металлоредуктаз и тиоредоксин/тиоредоксинредуктазных систем), а также возможность применения иммобилизованных клеток и биопленок СРБ в эффективной биоремедиации природных вод, почв и промышленных стоков.

Ключевые слова: сульфатредуцирующие бактерии (СРБ), биоремедиация, тяжелые металлы, металлоиды, радионуклиды, металлоредуктазы

DOI: 10.31857/S0555109923020034, **EDN:** LKVILK

Загрязнение окружающей среды токсичными тяжелыми металлами, металлоидами и радионуклидами представляет собой проблему мирового значения, серьезно влияющую как на здоровье людей, так и на состояние биосферы в целом. Используемые в настоящее время традиционные физико-химические методы очистки шахтных и производственных сточных вод, а также почв, достаточно дороги, не всегда высокоэффективны и требуют применения специальных химических реагентов. В то же время, целый ряд микроорганизмов обладает способностью восстанавливать и удалять из растворов тяжелые металлы и металлоиды, поскольку их восстановленные формы часто менее растворимы и менее токсичны, чем окисленные [1]. Особый интерес для технологий биоремедиации подобного рода представляют сульфатредуцирующие бактерии (СРБ), поскольку

многие СРБ не нуждаются в сложных питательных средах, устойчивы к высоким концентрациям токсичных солей и способны эффективно восстанавливать тяжелые металлы как химически, образуя H_2S и элиминируя металлы путем осаждения их сульфидов, так и ферментативно, в частности, с помощью гидрогеназ и цитохромов *c*-типа в присутствии водорода как донора электронов [2–4].

Сульфатредуцирующие бактерии представляют собой филогенетически неоднородную группу анаэробных микроорганизмов, объединенных общей физиологической чертой — способностью к диссимиляционному восстановлению сульфатов до сульфидов. В качестве донора электронов СРБ способны использовать более сотни органических субстратов, преимущественно, низкомолекулярных, а также молекулярный водород.

Лактат и пропионат являются типичными субстратами для неполного окисления до ацетата из-за незамкнутого ЦТК, который в основном осуществляют представители родов *Desulfovibrio* и *Desulfobulbus*. Субстратами для СРБ, способными к полному окислению до CO_2 , часто являются жирные кислоты. В качестве терминального акцептора электронов может выступать целый ряд органических и неорганических соединений, но в основном, сульфаты, тиосульфаты и сульфиты [5]. Таким образом, СРБ играют очень важную роль в глобальных биогеохимических циклах серы и углерода.

СРБ могут существовать в самых разнообразных условиях окружающей среды и широко распространены в природе: их обнаруживают, например, в морских донных отложениях [6, 7], микробных матах [8] и в толще морских вод [9]. В большом количестве присутствуют они и в биопленках, в том числе и в анаэробных зонах водоочистных сооружений [10]. СРБ были найдены также в местообитаниях с экстремальными значениями pH (кислые шахтные воды с pH 2.0 [11] и содовые озера с pH 10.5 [12]) и температуры (гидротермы [13]). Долгое время считалось, что сульфатредукторы, будучи строгими анаэробами, способны существовать исключительно в бескислородных местообитаниях, однако современные исследования указывают на высокую аэротолерантность многих видов СРБ, обладающих эффективными ферментативными механизмами защиты клеток от окислительных стрессов [14].

В соответствии с результатами сравнительного анализа генов 16S рРНК описанные к настоящему времени сульфатредуцирующие микроорганизмы делятся на семь филогенетических групп, пять из которых входят в домен *Bacteria*, а две — в домен *Archaea* [5]. Основная часть представителей СРБ относится к типу *Proteobacteria*, а именно к классу δ -*Proteobacteria*, а также к типу *Firmicutes*, классу *Clostridia*. Класс δ -*Proteobacteria* включает в себя грамотрицательные преимущественно мезофильные формы, а класс *Clostridia* — грамположительные спорообразующие формы. Три семейства из типа *Nitrospirae* содержат исключительно термофильные СРБ (роды *Thermodesulfovibrio*, *Thermodesulfobacterium* и *Thermodesulfobium*). В домене *Archaea* сульфатредукторы обнаружены в двух типах — *Crenarchaeota* (роды *Thermocodium* и *Calditerrivibrio*) и *Euryarchaeota* (род *Archaeoglobus*).

За последнее время накоплен достаточно большой массив данных как по процессам химического и ферментативного восстановления токсичных металлов, металлоидов и радионуклидов, так и по оптимальным параметрам, требующимся для биоремедиации почв и сточных вод в различных физико-химических условиях при помощи СРБ. Кроме того, использование молекулярно-генети-

ческих методов позволило обнаружить в клетках СРБ принципиально новую металл-редуктазную систему с участием тиоредоксина [15], представляющую интерес для изучения в качестве потенциальной основы для разработки биокатализаторов и высокоэффективных ферментативных систем очистки от тяжелых металлов. В настоящем обзоре мы постарались осветить ключевые вопросы и перспективы биоремедиации экосистем от тяжелых металлов, металлоидов и радионуклидов с применением сульфатредуцирующих микроорганизмов.

ЗАГРЯЗНЕНИЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ И МЕТАЛЛОИДАМИ

Согласно ГОСТ Р 17.4.3.07–2001: “Тяжелые металлы — группа металлов с атомной массой более 50 (Pb, Cd, Ni, Cr, Zn, Cu, Hg), которые при определенных концентрациях могут оказывать токсичное действие”. Также в обзоре будут рассмотрены металлоиды (мышьяк, селен) и радионуклиды (технеций, уран), тоже представляющие опасность для окружающей среды и поддающиеся утилизации методами биоремедиации аналогично тяжелым металлам.

В результате значительного использования тяжелых металлов в различных отраслях промышленности загрязненность ими окружающей среды значительно возросла [16]. Несмотря на присутствие тяжелых металлов в земной коре, основным источником загрязнения служит именно антропогенная деятельность: горнодобывающая и литейная промышленности, а также производство пластмассы, текстиля, бумаги и т.д. [17, 18]. Годовой выброс в биосферу тяжелых металлов и металлоидов огромен и достигает, в частности, для мышьяка 120 тыс. т, для селена 79 и 30 тыс. т для кадмия [19]. Природные явления, такие как выветривание и извержения вулканов, также вносят определенный вклад в загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами и металлоидами [20]. Многократно возросшая циркуляция токсичных солей металлов и металлоидов в почве, воде и воздухе, влекущая за собой их неизбежное попадание в пищевые цепи и, следовательно, в продукты питания человека, является серьезной проблемой, скрывающей в себе, в том числе, риски для здоровья будущих поколений и нормального функционирования экосистем.

Некоторые тяжелые металлы являются незаменимыми элементами, необходимыми для протекания различных биохимических и физиологических реакций в организме; часто они входят в состав ключевых ферментов. Однако необходимые для живых организмов в малых дозах, в избыточном количестве эти микроэлементы оказывают повре-

ждающие воздействия на ткани и органы, приводя к возникновению ряда тяжелых заболеваний [21].

Хром (Cr) представляет собой твердый металл стального цвета (относят к черным металлам). В водные экосистемы хром попадает в природе при выветривании горных пород, с пылью из атмосферы, с дождевыми стоками. Концентрация хрома в реках и озерах обыкновенно не превышает 0.5 нМ [22], тогда как в морях его уровень составляет 0.1–16 нМ [23]. Хром имеет несколько степеней окисления, варьирующих от Cr^{2+} до Cr^{6+} , наиболее стабильны Cr^{3+} и Cr^{6+} . Хром(III) является микроэлементом, необходимым большинству живых организмов, он проникает в клетки благодаря транспортной системе сульфат/фосфат-анионов [24]. При этом даже небольшое повышение уровня Cr(VI) в почвах и сточных водах вызывает экологические проблемы и угрожает здоровью людей по причине его высокой токсичности и канцерогенности, приводящим к повреждениям ДНК и сшиваниям молекул ДНК-белок [24–26]. Хром широко используется в различных производственных областях (металлургия, гальванизация, производство бумаги, красок, выделка кож), а его концентрация в промышленных стоках часто достигает 2000–5000 мг/л при рекомендованной норме в 2 мг/л [27].

Токсичное действие Cr(VI) обусловлено как его собственной окислительной активностью, так и формированием свободных радикалов в реакции восстановления $\text{Cr(VI)} \rightarrow \text{Cr(III)}$. Соли Cr(VI) , как правило, хорошо растворимы в воде и более биодоступны по сравнению с плохо растворимыми солями трехвалентного хрома. Содержание и тип ионов хрома в сточных водах зависит от характера производственного процесса, pH, концентрации органического вещества [28]. При нейтральном или слабощелочном pH в стоках преобладает малорастворимый Cr(OH)_3 , однако высокое содержание органического вещества может привести к образованию растворимых металлоорганических комплексов Cr(III) , ингибирующих многие ферменты [29].

Кадмий (Cd) — металл, близкий по свойствам к цинку; обычно существует в форме двухвалентного катиона (например, CdCl_2) [30]. В земной коре кадмий входит, в основном, в состав цинковых или свинцовых руд, плавление которых является основным источником попадания кадмия в окружающую среду [31]. В промышленности Cd применяется при производстве телевизионных экранов, лазеров, аккумуляторных батарей, пигментов, а также для гальванизации сталей [30]. ПДК кадмия в питьевой воде согласно СанПиН 2.1.4.1074-01 составляет 1 мкг/л.

Ткани организма человека адсорбируют 10–50% вдыхаемого с парами кадмия и 5–10% попавшего с пищей; при этом повышенная адсорбция кад-

мия отмечается в ЖКТ людей с недостаточностью по железу, кальцию или цинку [32].

В Китае многие рисовые поля, орошаемые сточными водами, теряют урожайность именно из-за высоких концентраций кадмия, 45–60% которого в загрязненных почвах содержится в обменной фракции, 35–55% приходится на фракцию оксидов Fe–Mn, а незначительная часть присутствует в карбонатной и органической фракциях [33]. Токсическое действие кадмия проявляется в виде эпигенетических изменений в ДНК и повреждении белков (за счет связывания сульфгидрильных, карбоксильных и аминных групп). Растворимые соединения кадмия поражают ЦНС, печень и почки, нарушают фосфо-кальциевый обмен; хроническое отравление приводит к анемии и повреждению костной ткани [30].

Мышьяк (As) является металлоидом и присутствует в природе в четырех различных состояниях — As^{5+} , As^{3+} , As^0 и As^{3-} . Мышьяк находится в окружающей среде преимущественно в составе сульфидных минералов: реальгар (AsS), аурипигмент (As_2S_3), арсенопирит (FeAsS) [34]. В морской воде концентрация мышьяка колеблется в пределах 0.09–24.0 мкг/л, в пресной — 0.15–0.45 мкг/л [34]. В минеральных водах концентрация мышьяка может в 300 и более раз превышать среднее значение для грунтовых вод. В водных экосистемах мышьяк находится в виде мышьяковой или ортомышьяковистой кислот и их солей. Неорганические соединения мышьяка подвергаются метилированию бактериями и грибами с образованием метиларсоновой и диметиларсиновой кислот, а также газообразного арсина [35].

Основным антропогенным источником загрязнения мышьяком грунтовых вод и почв является плавка медных, никелевых, свинцовых и цинковых руд. Годовой выброс мышьяка в окружающую среду достигает 62000 т, причем 80% приходится на долю медеплавильных комбинатов [35, 36]. Содержание мышьяка в шахтных водах стран Юго-Восточной Азии, Африки и Латинской Америки колеблется в пределах 5–72 мг/л. Другим антропогенным источником мышьяка является сжигание ископаемого топлива в домашних хозяйствах и на электростанциях [34, 36]. Важным источником антропогенного загрязнения мышьяком было использование фунгицидов, гербицидов и инсектицидов на его основе. В таких сельскохозяйственных почвах содержание мышьяка может достигать 2 г/кг [37].

Накопление мышьяка приводит к многочисленным нарушениям в организме человека. Была показана тесная связь между отравлением мышьяком и повышенным риском возникновения онкологических заболеваний и системных физиологических нарушений [38]. Мышьяк поражает сердечно-сосудистую и дыхательную системы,

Таблица 1. Ключевые белки, участвующие в восстановлении металлов и металлоидов клетками СРБ

Белок	Пример микроорганизма	Металл, металлоид
Цитохром c_3 (периплазматический)	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> <i>Desulfomicrobium norvegicum</i>	Хром (Cr), уран (U)
Цитохром c -типа (мембранный)	<i>Desulfomicrobium</i> sp.	Мышьяк (As)
[Fe]-гидрогеназа	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Хром (Cr)
[Ni–Fe]-гидрогеназа	<i>Desulfovibrio fructosovorans</i>	Хром (Cr), технеций (Tc)
[Ni–Fe–Se]-гидрогеназа	<i>Desulfomicrobium norvegicum</i>	Хром (Cr)
Ферредоксин II	<i>Desulfovibrio gigas</i>	Хром (Cr)
ArsC-подобный белок (цитоплазматический)	<i>Desulfovibrio</i> sp.	Мышьяк (As)
Металл-редуктаза MreG	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Хром (Cr), уран (U)

кожные покровы, почки и ЖКТ [39, 40]. Токсичность арсенита в 2–10 раз превышает таковую арсената, а органические соединения мышьяка менее токсичны, чем неорганические [39]. Связываясь с тиоловыми или сульфгидрильными группами, арсенит ингибирует более 200 ферментов, а арсенат, в свою очередь, может замещать фосфат. Соединения мышьяка способны также ингибировать репарацию ДНК и вызывать хромосомные аберрации [41].

Селен (Se) — металлоид черного цвета, широко распространенный в природе. Преимущественный вклад в его распространение вносят вулканическая активность, сжигание ископаемого топлива, выветривание скал и почв, перенос грунтовыми водами, осаждение минералов, химическое или бактериальное осаждение, метаболизм человека и растений. Селен может находиться в окружающей среде в форме Se^{2-} , Se^0 , SeO_3^{2-} и SeO_4^{2-} . Селениды металлов, сульфиды селена и элементный селен — нерастворимы и поэтому биологически недоступны [42]. В большинстве почв и природных вод преобладают селениты и селенаты: селениты адсорбируются на твердых частицах, преимущественно на оксигидроксидах железа; селенаты, напротив, обладают высокой подвижностью и биологической активностью, адсорбируются плохо. В антропогенных экосистемах селен присутствует, в основном, в сельскохозяйственных дренажных стоках, шахтных водах с низким pH и газообразных продуктах сероочистки [42].

В зависимости от концентрации, селен является как полезным микроэлементом для людей и некоторых животных и растений, так и токсичным. Отравление селеном у животных наступает при его ежедневном употреблении с пищей в концентрации более 4 мг/кг веса [43].

Уран (U) — природный актиноид, радиоактивный металл, в малых количествах встречающийся во всех горных породах, почвах и водах; он занимает 51 место по встречаемости среди химических элементов земной коры. Средняя концентрация

урана в земной коре составляет 2–4 мг/кг [44]. Уран входит в состав сотен минералов, включая наиболее часто встречающийся уранинит, карнотит, торбернит и другие, наиболее стабильны валентные состояния U(VI) и U(IV). Мировая продукция урана в 2010 г. достигала 54000 т, из которых 17803 т (33%) вырабатывалось в Казахстане. Отравление ураном приводит к нарушению функции почек, мозга, печени, сердца и других органов, поскольку, наряду со слабой радиоактивностью, он является достаточно токсичным металлом [44], серьезно воздействуя, в том числе, и на репродуктивные функции [45].

Технеций является продуктом распада урана ^{235}U , это радиоактивный переходный металл сербристо-серого цвета. Наиболее распространенный радиоактивный изотоп ^{99}Tc имеет период полураспада 2.1×10^5 лет. Технеций входит в состав промышленных вод, образующихся в результате переработки ядерного топлива [46]. Наиболее стабилен ион пертехнетата TcO_4^- , обладающий чрезвычайной подвижностью в окружающей среде. Пертехнетаты способны включаться в пищевые цепи и активно ассимилируются растениями с помощью системы транспорта сульфата [47], поэтому очистка сточных вод от содержащегося в них технеция крайне необходима. Вследствие низкой растворимости восстановленного технеция, в частности, оксидов Tc(IV) и Tc(V), микробное восстановление пертехнетатов было предложено в качестве основы для биотехнологической очистки ряда стоков атомной промышленности [1, 46].

Как уже упоминалось выше, наряду с химическим осаждением тяжелых металлов путем образования их нерастворимых сульфидов, СРБ обладают рядом белков, обладающих металл-редуктазной активностью (табл. 1). Ниже мы подробнее остановимся на механизмах восстановления различных тяжелых металлов, металлоидов и радионуклидов клетками СРБ.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ И АККУМУЛЯЦИЯ ХРОМА КЛЕТКАМИ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Ферментативные механизмы восстановления Cr(VI). Способность целого ряда микроорганизмов восстанавливать высокотоксичные и хорошо растворимые в воде соли Cr(VI) до менее токсичных и слабо растворимых солей Cr(III) давно обратила на себя внимание исследователей [1, 48]. Долгое время наиболее изученным микроорганизмом в этой области оставался *Enterobacter cloacae* [49]. Однако удаление Cr(VI) из промышленных стоков с помощью этой бактерии представлялось затруднительным, так как сульфаты и тяжелые металлы ингибировали процесс восстановления хрома клетками *E. cloacae* [50]. Открытие того факта, что некоторые представители СРБ рода *Desulfovibrio* способны к восстановлению Fe(III) и U(VI) не только химически, за счет образуемого H₂S, но и ферментативно [51, 52], навело исследователей на мысль и о возможной хроматредуктазной активности в клетках этих бактерий. Действительно, такая активность была вскоре обнаружена [53]: клетки *Desulfovibrio vulgaris* демонстрировали H₂-зависимое восстановление Cr(VI) до Cr(III). Восстановление Cr(VI) также происходило в присутствии очищенных гидрогеназ и полигемовых цитохромов c₃ *D. vulgaris* при внесении в раствор H₂.

В отличие от *E. cloacae*, восстановление Cr(VI) до Cr(III) клетками *D. vulgaris* не ингибировалось сульфатом даже при его высоких концентрациях (50 мМ). Также клетки демонстрировали сохранение хроматредуктазной активности при добавлении в питательную среду до 100 мкМ NiCl₂, MnSO₄, CoCl₂, CuCl₂ и ряда других токсичных металлов [53]. Позже было показано, что способность к ферментативному восстановлению хромата широко распространена среди различных СРБ, в частности, у *Desulfomicrobium norvegicum*, *Desulfomicrobium escambiense*, *D. vulgaris* Hildenborough, *Desulfovibrio gigas* и *Desulfovibrio desulfuricans* [2]. Таким образом, СРБ являются весьма перспективными микроорганизмами для биоремедиации анаэробных сточных и промышленных вод, а также морских осадков, загрязненных хроматами.

Были изучены эффекты, оказываемые высокими концентрациями хрома на клетки *D. norvegicum* DSM 1741: бактерии были способны к делению при концентрации хромата в питательной среде до 500 мкМ. При более высоком содержании хрома морфология клеток изменялась с палочковидной на филаментную. Восстановление Cr(VI) в отсутствие сульфата не было связано с ростом. В присутствии хромата наблюдали выход периплазматических белков и цитохромов типа c в окружающую среду, что свидетельствовало о нарушении целостности внешней мембраны кле-

ток [2]. Изучение взаимодействия между Cr(VI) и полигемовыми цитохромами на молекулярном уровне с помощью ЯМР показало наличие в структуре цитохромов специфических сайтов связывания атомов хрома [54].

Был проведен сравнительный анализ хроматредуктазной активности полигемовых цитохромов c, выделенных из различных видов сульфат- и сероредуцирующих бактерий [2]. Показано, что активность тетрагемового цитохрома c₃ из *D. norvegicum* вдвое превышает такую тетрагемового цитохрома c₃ из *D. vulgaris* Hildenborough или тригемового цитохрома c₇ из *Desulfuromonas acetoxidans* (табл. 2). Однако цитохром c₅₅₃ *D. vulgaris* Hildenborough не проявлял хроматредуктазной активности, что свидетельствует о критичной важности гемов с отрицательным редокс-потенциалом для ферментативного восстановления металлов. Сайт-направленный мутагенез в отношении цитохромов типа c подтвердил это предположение [2].

Было показано, что в дополнение к полигемовым цитохромам типа c с низким редокс-потенциалом, способностью к восстановлению хроматов обладают периплазматические [Fe]-, [Ni-Fe]- и [Ni-Fe-Se]-гидрогеназы, выделенные у представителей родов *Desulfovibrio* и *Desulfomicrobium*. Причем хроматредуктазная активность [Fe]-гидрогеназы из *D. vulgaris* Hildenborough оказалась наиболее высокой (табл. 2) [2]. Константа Михаэлиса по отношению к Cr(VI) была одинаковой для [Fe]- и [Ni-Fe-Se]-гидрогеназ, что свидетельствует о прямой корреляции скорости восстановления Cr(VI) до парамагнитного Cr(III) со скоростью поглощения водорода. Эксперименты с [3Fe-4S]-ферредоксином II из *D. gigas* показали, что в процессе восстановления металлов гидрогеназами участвуют негемовые [Fe-S]-кластеры с низким редокс-потенциалом [55]. Была предложена схема переноса электронов между активными центрами [Ni-Fe]-гидрогеназы при восстановлении хроматов (рис. 1).

Таким образом, за восстановление Cr(VI) *in vivo* клетками СРБ отвечают сразу несколько ферментов, имеющих низкий редокс-потенциал. Это хорошо проиллюстрировал эксперимент с мутантным штаммом *D. vulgaris* Hildenborough Hyd 100, несущим делецию в опероне [Fe]-гидрогеназы: такие клетки не потеряли способность восстанавливать Cr(VI), хотя и осуществляли это с существенно меньшей скоростью [55].

Энзиматическое восстановление Cr(VI) покоящимися клетками *D. vulgaris*, использующими молекулярный водород, требует наличия в буферном растворе комплексобразующих лигандов или хелатирующих агентов, например, таких как, нитрилтриуксусная кислота, ЭДТА, ДТПА (диэтилентриаминпентауксусная кислота), пентетовая кислота, цитрат или гидрокарбонат натрия. Стиму-

Таблица 2. Скорость восстановления хрома и мышьяка различными ферментами, выделенными и очищенными из клеток СРБ [по 2, 55, 56]

Фермент	Микроорганизм	Скорость восстановления, мкмоль/мин на мг белка
Цитохром c_3	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	391 (Cr)
Цитохром c_3	<i>Desulfomicrobium norvegicum</i>	739 (Cr)
Цитохром c_7	<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	557 (Cr)
Цитохром c_3 H35M	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	400 (Cr)
Цитохром c_3 H22M	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	341 (Cr)
[Fe]-гидрогеназа	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	7679 (Cr)
[Ni-Fe-Se]-гидрогеназа	<i>Desulfomicrobium norvegicum</i>	161 (Cr)
[Ni-Fe]-гидрогеназа	<i>Desulfovibrio fructosovorans</i>	80 (Cr)
Арсенатредуктаза (мембранная)	<i>Desulfomicrobium</i> sp.	98 (As)
Арсенатредуктаза (цитоплазматическая)	<i>Desulfovibrio</i> sp.	1.6 (As)

лирующий эффект этих лигандов на скорость восстановления Cr(VI) коррелирует с силой связывания иона металла лигандным/хелатирующим комплексом Cr(III). Максимальную скорость восстановления Cr(VI) наблюдали при использовании ДТПА и цитрата натрия – до 26.36–29.13 нмоль/ч на мг сухой биомассы [57]. Применение нитрилтриуксусной кислоты или ЭДТА в масштабных биоремедиационных процессах представляется экономически неоправданным, в то время как бикарбонат, цитрат и формиат в достаточном количестве присутствуют во многих анаэробных экосистемах; в частности, формиат может выступать как донор электронов

для биологического восстановления Cr(VI), а также формировать комплекс с Cr(VI) в растворах [57].

Токсическое воздействие Cr(VI) на клетки СРБ.

Для оценки эффекта тяжелых металлов на биоэнергетический метаболизм клеток с целью выявления наиболее устойчивых к хроматам штаммов СРБ, пригодных для использования в биоремедиационных процессах, был предложен метод изотермальной микрокалориметрии. Эксперименты проводили на *Desulfomicrobium norvegicum* и *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough [58]. Было показано, что в присутствии высоких (125–250 мкМ) concentra-

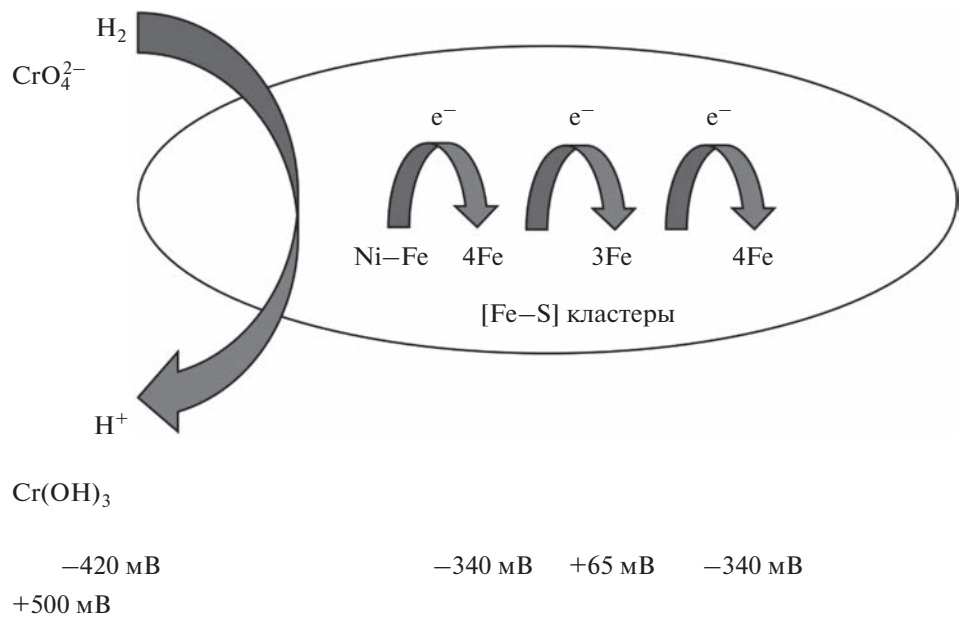


Рис. 1. Предполагаемый механизм восстановления хромата [Ni-Fe]-гидрогеназами СРБ [по 55].

ций Cr(VI) наступает ингибирование роста, которому сопутствует выделение энергии. По всей видимости, СРБ используют энергию, полученную при катаболизме лактата, на понижение вначале ОВП среды. Таким образом, восстановление Cr(VI) до Cr(III) может выполнять защитную функцию, позволяющую клеткам поддерживать условия внешней среды пригодными для жизни [58]. Эффект, оказываемый Cr(VI) на клетки, сопоставим с описанной ранее реакцией представителей рода *Desulfovibrio* на окислительные стрессы, при которой также наблюдалось отсутствие роста и изменение морфологии клеток [59].

Однако недавно было показано, что не только высокие концентрации Cr(VI) как таковые, но и снижение температуры, а также соотношение донор/акцептор и концентрации хромата оказывают значительное отрицательное влияние на жизнеспособность клеток *D. vulgaris* Hildenborough [60]. При этом поиск эффективных средств, защищающих клетки бактерий от токсического воздействия тяжелых металлов показал, что в процессе восстановления хромата цитрат может не только выступать как источник углерода, но и маскировать токсичность шестивалентного хрома (значение ингибирующей концентрации IC_{50} цитрата было выше, чем у лактата), и что цитрат в водном растворе также может выполнять роль эффективного антиоксиданта [61].

Аккумуляция хрома клетками СРБ. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии и анализа химического состава клеток была исследована аккумуляция хрома клетками *D. vulgaris* Hildenborough, выращенных при довольно высокой (250 мкМ) концентрации Cr(VI). Элементный анализ показал, что аккумуляция восстановленного трехвалентного хрома в ранней логарифмической фазе роста культур происходила не только на поверхности клеток, но и на внешней и внутренней мембранах [3].

Минеральные отложения, как связанные с клетками, так и находящиеся в окружающей среде, имели одинаковые спектроскопические характеристики. Они состояли из Cr(III), фосфата и небольших количеств кальция — предполагаемая формула соединения $Ca_{0.34}Cr_{0.7735}(PO_4)$. Таким образом, было получено прямое доказательство минерализации хрома на биологических мембранах с точным определением его степени окисления [3].

Несмотря на то, что специфическая транспортная система для хрома в клетках бактерий, по всей видимости, отсутствует, он может проникать в последние посредством сульфатного пути, как это было описано для *Pseudomonas fluorescens* [62]. По-видимому, и в клетки *D. vulgaris* Hildenborough хром проникает через сульфатную транспортную систему [3]. Внутриклеточное образование H_2S может вносить свой вклад в осаждение хроматов, однако данные электронной микроскопии говорят

в пользу именно биологического осаждения, происходящего с участием периплазматических или мембран-связанных цитохромов c_3 и гидрогеназ [3, 55].

Процесс восстановления Cr(VI) клетками часто рассматривается как адаптивная стратегия, позволяющая привести ОВП окружающей среды к оптимальному уровню [58]. Однако минеральные отложения уменьшают свободную площадь поверхности клетки, приводя, в конечном счете, к ее гибели в условиях высоких концентраций хромата и формированию отложений фосфатов хрома в среде [3]. Такая адаптация, по всей видимости, может использоваться СРБ не только в присутствии Cr(VI), но и ряда других токсичных металлов — Tc(VII), U(VI), Pd(II), V(V) и др.

Восстановление Cr(VI) смешанными культурами СРБ, иммобилизованными клетками и клетками в биопленках. Способность некоторых смешанных культур СРБ в составе биопленок к восстановлению даже 500 мкМ растворов Cr(VI) с использованием лактата весьма высока. Так, было показано, что через 48 ч культивирования 88% Cr(VI) было удалено из раствора [63].

Было проведено сравнение скорости восстановления Cr(VI) биопленками, содержащими клетки *D. norvegicum* и консорциум СРБ (названный СН10), выделенный из выработанной шахты золотодобычи, при росте на ацетате и CO_2 с H_2 в качестве источника электронов. Периодическое культивирование с использованием прикрепленных биопленок консорциума СН10 показало, что в присутствии 500 мг/л H_2S (химическое восстановление хромата) за 15 мин было восстановлено 50 мг/л Cr(VI), в то время как в отсутствие H_2S клеткам требовался 1 ч, чтобы восстановить 16 мг/л Cr(VI) в ходе ферментативного процесса. При непрерывном культивировании биопленок, содержащих клетки СН10 и *D. norvegicum*, максимальная скорость восстановления Cr(VI) достигала 90 мг/л $ч^{-1} г^{-1}$ белка. Необходимо отметить, что хромат оказывал негативное влияние на способность клеток СРБ к восстановлению сульфата, тем не менее, клетки сохраняли свою жизнеспособность [64].

СРБ, иммобилизованные на цеолите, способны удалять из загрязненной морской воды Cu(II), Ni(II), Cr(VI) в микромолярных концентрациях с эффективностью до 98, 90 и 99% соответственно [65].

Необходимо напомнить, что в присутствии больших концентраций сульфата образуется много сульфида, который ингибирует рост бактерий и снижает эффективность восстановления Cr(VI). Эксперимент с микрокосмами с добавлением органического субстрата-носителя (viscous carbon and sulfate-releasing colloidal substrates, VCSRCS, медленно высвобождает в среду источник углерода и сульфат), показал 100% восстановление ше-

стивалентного хрома с образованием осадков $\text{Cr}(\text{OH})_3$ и Cr_2O_3 . Добавление VCSRCS вызывало увеличение общей популяции бактерий, экспрессию гена *dsrA* (кодирующего α -субъединицу дисимилиационной (би)сульфитредуктазы в клетках СРБ), и восстановление $\text{Cr}(\text{VI})$. В составе микробного сообщества микрокосма (биобарьер) были детектированы представители родов *Exiguobacterium*, *Citrobacter*, *Aerococcus* и нескольких родов СРБ [66].

Консорциум СРБ, выделенный из загрязненных донных осадков у морского побережья Гонконга (КНР), практически полностью (98.5%) ферментативно восстанавливал 600 мкМ $\text{Cr}(\text{VI})$ за 168 ч со скоростью 0.5 г Cr^{6+} /г белка в час. При использовании $\text{Cr}(\text{VI})$ в качестве единственного акцептора электронов в бессульфатной питательной среде скорость его восстановления снижалась в два раза [67].

С использованием биореактора изучали также влияние начальных концентраций хромата, различных источников углерода, температуры и времени инкубации с загрязненными сточными водами на процессы восстановления сульфата и хрома(VI) консорциумом СРБ [68]. Было показано, что максимальное удаление хромата (96.8%) и сульфата (82%) происходило при росте на лактате, температуре 37°C и при начальной концентрации $\text{Cr}(\text{VI})$ 50 мг/л. Поскольку НАДН-зависимая хроматредуктазная активность обнаружена не была, это свидетельствовало об анаэробной природе консорциума [68]. В аналогичном проточном анаэробном биореакторе с активным илом при одновременном наличии в среде сульфатов и хроматов было показано два пути восстановления и удаления хроматов: химическое восстановление хромата образованным бактериями сульфидом (90%), а оставшиеся 10% приходились на прямое ферментативное восстановление хрома(VI) [69]. При анализе микробного сообщества биореактора оказалось, что СРБ составляли 11.1% всего бактериального сообщества, таким образом, они могли играть основную роль в удалении хроматов в биореакторе. Также, были детектированы бактерии рода *Microbacterium*, способные к использованию $\text{Cr}(\text{VI})$ как акцептора электронов, и возможно, они также отвечают за ферментативное восстановление хрома [69].

В поддержку смешанного механизма восстановления $\text{Cr}(\text{VI})$ в присутствии сульфата высказываются и другие исследователи [70], которые выделили и охарактеризовали из промышленных стоков, содержащих $\text{Cr}(\text{VI})$, высокоустойчивый к нему штамм *Desulfovibrio*, способный восстанавливать 500 мг/л хрома при pH 7.0 и 35°C в течение 24 ч. Кинетические расчеты показали, что основную роль в восстановлении хрома играет образо-

вание H_2S под действием бактериальных редуктаз [70].

Весьма эффективным для биоремедиации $\text{Cr}(\text{VI})$ оказался бионанокатализатор Bio-Pd(0), представляющий собой наночастицы палладия, восстановленного и затем адсорбированного покрывающимися клетками *D. vulgaris* NCIMB 8303 и *D. desulfuricans* NCIMB 8307 [71]. Авторами была предложена трехступенчатая схема очистки, при которой водород в качестве донора электронов вырабатывается *E. coli* в процессе переработки сахаросодержащих сточных вод, затем часть его используется *D. desulfuricans* для восстановления Pd(II) до Pd(0) из жидких стоков предприятий электронной промышленности с использованием гидрогеназы, а оставшееся количество водорода – в опосредованном Bio-Pd(0) восстановлении $\text{Cr}(\text{VI})$ до гораздо менее токсичного $\text{Cr}(\text{III})$. Процесс восстановления $\text{Cr}(\text{VI})$ с помощью каталитических суспензий клеток был схож с использованием Bio-Pd(0) как на основе *D. vulgaris*, так и *D. desulfuricans*, достигая 170 нмоль $\text{Cr}(\text{VI})$ /мг Bio-Pd(0) в час. При использовании иммобилизованных в агарозном матриксе клеток *D. vulgaris* наиболее эффективное восстановление было достигнуто при следующих условиях непрерывного культивирования – 7.5 мг Bio-Pd(0)/мл агара (соотношение сухой биомассы клеток к палладию 3 : 1), концентрации $\text{Cr}(\text{VI})$ 100 мкМ и скорости протока 1.75 мл/ч [71].

ВОССТАНОВЛЕНИЕ И АККУМУЛЯЦИЯ КАДМИЯ КЛЕТКАМИ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Одними из самых устойчивых СРБ к высоким концентрациям кадмия являются штаммы *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 и *Desulfococcus multivorans* DSM 2059. Они способны окислять лактат и осуществлять процесс сульфатредукции в присутствии 0.5 mM CdCl_2 [72]. Трансмиссионная электронная микроскопия выявила аккумуляцию кадмия внутри клеток и в периплазме. Анализ известных генетических детерминант устойчивости бактерий к тяжелым металлам выявил у этих штаммов, а также у *Desulfomicrobium norvegicum* I1, гены *smtAB* (имеющие высокую гомологию транслированных нуклеотидных последовательностей к металлотионеинам *Synechococcus* spp.), а также гены системы устойчивости к кадмию – *cadA* (кодирует АТФазу Р-типа, участвующую в транспорте ионов тяжелых металлов через клеточную мембрану), *cadC* (регуляторный ген для *cadA*) и *cadD* (кодирует металл-связывающий белок). Эти данные свидетельствуют о присутствии сразу нескольких генетических механизмов устойчивости к кадмию в клетках исследованных СРБ [72].

Использование СРБ для эффективной биоремедиации загрязненных кадмием почв может оказывать положительный экологический эффект. Хотя эти технологии и не приводят к уменьшению общего количества Cd, но значительно изменяют его распределение между геохимическими фракциями. Полученные результаты [33] показали, что внесение культур СРБ в переувлажненную почву способно существенно, примерно на 70%, снизить долю обменной фракции кадмия, которая легко поглощается растениями и попадает в пищевые цепи, и, таким образом, уменьшить его биодоступность в почве. Необходимо отметить, что скорость сульфатредукции падает при возрастании общей концентрации кадмия в загрязненной почве [33].

Результаты многолетних экспериментов в анаэробном биореакторе показали, что внесение Cd(II) приводило к усилению удаления сульфатов и образованию CdS. Большая часть водного Cd(II) (86.3%) удалялась в ходе реакций осаждения. Установлено, что образующиеся осадки были представлены преимущественно в карбонатной, Fe–Mn оксидной, сульфидно-связанной формах, на долю которых приходилось 92.6–93.9% общего содержания кадмия. Доминирующими СРБ в биореакторе оказались представители родов *Desulfurella*, *Desulforhabdus* и *Desulfovibrio*, а в качестве основных конкурентов с ними за утилизацию субстрата были идентифицированы метаногенные археи [73].

Также было продемонстрировано удаление кадмия из загрязненных стоков с помощью биореактора с имитацией анаэробных условий на заболоченных территориях. Внесение сульфата и органического субстрата в виде лигноцеллюлозы позволили, благодаря росту СРБ, существенно увеличить эффективность удаления кадмия и цинка за счет их осаждения в виде сульфидов [74].

ВОССТАНОВЛЕНИЕ И АККУМУЛЯЦИЯ МЫШЬЯКА КЛЕТКАМИ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Первой описанной СРБ, способной к восстановлению арсената, была *Desulfotomaculum auripigmentum*, первоначально описанная как штамм OREX-4 [75]. *D. auripigmentum* получает энергию в ходе восстановления сульфата или арсената (при концентрации до 5 мМ), причем последний является более энергетически выгодным. И арсенат-, и сульфатредукция ингибируются молибдатом [76]. Осаждение арсенита клетками СРБ происходит за счет сопряжения процессов восстановления S(VI) до S(-II) и арсената As(V) до As(III), приводящего к появлению в растворе сульфид-ионов, которые связываются с арсенитом, формируя нерастворимый трисульфид мышьяка (As₂S₃),

химическая стабильность которого сильно зависит от pH [75, 77–80].

Детальное изучение процесса аккумуляции мышьяка показало, что для него крайне важно определенное соотношение скоростей восстановления сульфата и арсената, так как этот процесс происходит только тогда, когда концентрация арсенита в растворе достигает 1 мМ, а содержание сульфита все еще невелико (0.01–0.1 мМ) [75]. Трансмиссионная электронная микроскопия показала, что осадок As₂S₃ может быть локализован как вне-, так и внутриклеточно. Накопление его со стороны внутренней мембраны не случайно, так как, предположительно, восстановление арсената сопряжено с работой электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) [75]. Восстановление сульфата клетками *D. auripigmentum* происходит только после того, как весь арсенат в растворе оказывается восстановленным до арсенита [75, 76].

В 2000 г. были описаны две новые СРБ, которые, в отличие от *D. auripigmentum*, были способны к одновременному восстановлению сульфата до сульфида и арсената до арсенита; лактат окислялся ими неполностью, до ацетата [56]. Штамм Ben-RA был отнесен к роду *Desulfovibrio*, штамм Ben-RB – к роду *Desulfomicrobium*. Скорости роста, а также процессов восстановления сульфата (8.3–9.6 мМ) и арсената (3.1–5.1 мМ) у этих СРБ были выше, чем у *D. auripigmentum* [56, 75]. Процесс сульфатредукции, осуществляемый штаммом Ben-RB, не ингибировался арсенатом, а арсенат мог использоваться в качестве конечного акцептора электронов при росте на минимальной питательной среде в отсутствие сульфата. Зависимая от бензилвиологена активность арсенатредуктазы была выше в клетках, растущих на сульфате/арсенате, по сравнению с клетками, растущими только на сульфате [56].

Штаммы Ben-RA и Ben-RB используют различные механизмы для восстановления арсената. В случае Ben-RA этот процесс не способен обеспечивать рост клеток. В геноме этого штамма был обнаружен гомолог гена *arsC*, входящего в R773 *ars* плазмидный оперон *E. coli*, который кодирует систему устойчивости к арсенату [56]. Предполагается наличие у штамма Ben-RA ArsC-подобного белка, обеспечивающего защиту клеток путем восстановления арсената As(V) до арсенита As(III). Это первый случай обнаружения системы устойчивости к арсенату у строгих анаэробов. *Desulfomicrobium* Ben-RB не имеет R773-подобной системы устойчивости к арсенату, вместо этого он осуществляет арсенатное дыхание, так как способен расти на минимальной питательной среде в присутствии As(V). Клетки Ben-RB, растущие на арсенате, обладают активной арсенатредуктазой (табл. 2), которая связана с клеточной мембраной. Она

представляет собой цитохром *c*-типа или ассоциирована с ним [56].

В удалении мышьяка из загрязненных вод клетками СРБ большую роль играет сопряженность процессов сульфат- и арсенатредукции, идущих в присутствии Fe(II), которое обеспечивает соосаждение сульфидов железа и мышьяка. Ключевыми ферментами в этих процессах являются диссимиляционная (би)сульфитредуктаза (*dsrAB*) и диссимиляционная арсенатредуктаза (*arsA*) [77].

ВОССТАНОВЛЕНИЕ И АККУМУЛЯЦИЯ СЕЛЕНА КЛЕТКАМИ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Несмотря на то, что СРБ, вероятно, не являются самыми эффективными микроорганизмами в биоремедиации экосистем от селена в высоких концентрациях, наличие у них металл-редуктазной активности широкого спектра действия делает целесообразным использование этих бактерий для биоремедиации сточных вод, в которых одновременно присутствуют несколько токсичных металлов и металлоидов. Необходимо отметить, что большинство СРБ весьма чувствительны к воздействию селена, так как он структурно сходен с сульфатом и способен ингибировать как ассимиляционную, так и диссимиляционную сульфатредукцию [81, 82]. На *D. vulgaris* Hildenborough было показано, что внесение Se в питательную среду приводит к сильному ингибированию синтеза периплазматических [Fe–Fe] и [Ni–Fe]-гидрогеназ, но к активации синтеза [Ni–Fe–Se]-гидрогеназы [83].

Восстановление оксианионов селена в концентрации 200 мкМ биопленками, содержащими клетки *D. norvegicum*, показало, что применение СРБ в биореакторах при росте на лактате (или водороде) и сульфате для эффективного удаления селена из загрязненных сточных вод потенциально возможно [84, 85]. В условиях лимитирования по сульфату селен ферментативно восстанавливался до селенида. При избытке сульфата восстановление селената преимущественно шло до элементного селена. Эксперименты с отмытыми клеточными суспензиями показали, что высокие концентрации сульфата ингибируют процесс специфического восстановления селената, тем не менее, увеличение биомассы за счет инкубации растущих клеток с избытком сульфата приводило к возрастанию скорости удаления вносимого селената. Ингибирующий эффект уменьшался при добавлении небольших количеств сульфита/тиосульфата [85].

Трансмиссионная электронная микроскопия показала, что элементный селен откладывается в виде сферических гранул, ассоциированных с клетками СРБ. Локализация гранул была преиму-

щественно периплазматической, но встречались также и внеклеточные преципитаты [84, 85]. Эти преципитаты формируются за счет абиотической реакции с образуемым в ходе диссимиляционной сульфатредукции сульфидом в условиях низкого ОВП и темноты. Когда биопленки с СРБ помещали в питательную среду, содержащую селенит, внутри их матрикса формировались селено-серные гранулы [84].

Описана также способность СРБ восстанавливать селенаты и селениты с образованием летучих соединений. Так, некоторые представители рода *Desulfovibrio* продуцируют диметилселенид и диметилдиселенид, при этом *D. gigas* выделяет приблизительно в 10 раз больше этих соединений, чем *D. vulgaris* [86].

Эффективное, вплоть до 97%, удаление оксианионов селена из загрязненных вод (до 790 мкг Se/л) сообществом СРБ было также продемонстрировано с использованием анаэробных биореакторов с иловой площадкой и восходящим потоком жидкости (технология Upflow Anaerobic Sludge Blanket, UASB) при нейтральном pH, температуре 30°C, с внесением сульфата и лактата. Рентгеноструктурный анализ показал, что селенаты в процессе восстановления частично конвертировались в коллоидные наночастицы Se⁰ и внутри клеток накапливался элементный селен [87].

ВОССТАНОВЛЕНИЕ И АККУМУЛЯЦИЯ ТЕХНЕЦИЯ КЛЕТКАМИ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

С началом изучения восстановления U(VI) клетками *Micrococcus lactyliticus* предполагалась параллельная возможность использования восстановления пертехнетата микроорганизмами в качестве основы биотехнологического метода очистки загрязненных Tc(VII) стоков [46, 88], так как известно, что несколько форм низковалентных оксидов технеция нерастворимы. Изучение восстановления технеция клетками *D. desulfuricans*, имеющего большой биоремедиационный потенциал в отношении загрязненных сточных вод, подтвердило эти предположения [89].

Покоящиеся клетки *D. desulfuricans* эффективно осуществляли процесс восстановления Tc(VII), сопряженный с окислением различных доноров электронов. Трансмиссионная электронная микроскопия показала, что восстановленный технеций осаждался в виде частиц нерастворимого низковалентного оксида эндогенно по периметру клеток. При наличии в среде лактата и сульфата наблюдалось формирование внеклеточных отложений сульфида технеция. Отношение сульфида к технецию в этих отложениях было очень высоким (5 : 1); в этом случае практически весь радионуклид был связан с H₂S и локализован внеклеточно. Оп-

тимальным донором электронов для биотрансформации технеция являлся водород, однако высокие скорости восстановления наблюдались и при росте клеток *D. desulfuricans* в проточном биореакторе на формиате и пирувате. Ферментативная активность сохранялась в течение нескольких недель и не ингибировалась кислородом [90].

В процесс восстановления $\text{Tc(VII)} \left(\text{TcO}_4^- \right)$ клетками *D. desulfuricans* с использованием формиата или водорода в качестве донора электронов вовлечена периплазматическая гидрогеназа, поскольку соли Cu(II) ингибировали ферментативное восстановление технеция [90]. Однако этот процесс был устойчив к 10–100 мМ нитрата, в особенности, при росте культур на водороде. Оптимальные условия – pH 5.5 и температура 20°C [91]. Скорость восстановления Tc(VII) клетками *D. desulfuricans* с использованием H_2 (0.8 ммоль восстановленного технеция/г сухой биомассы в час) была в 64 раза выше, чем клетками *E. coli* дикого типа, обладающими формиат-водород-лиазным комплексом. Имобилизованные клетки *D. desulfuricans* в биореакторе восстанавливали 80% радионуклида за 1.5 ч, тогда как клетки *E. coli* дикого типа – за 24.3 ч [91].

Ферменты, отвечающие за восстановление технеция клетками СРБ, были впервые изучены у *D. fructosovorans*. Показано, что этот процесс *in vivo* обусловлен активностью периплазматической $[\text{Ni-Fe}]$ -гидрогеназы. Это подтверждалось необходимостью присутствия H_2 в качестве донора электронов, ингибирующим эффектом Cu(II) , устойчивостью к O_2 , а также резкой потерей способности к восстановлению Tc(VII) мутантным штаммом с делецией оперона $[\text{Ni-Fe}]$ -гидрогеназы [92]. Константа Михаэлиса для восстановления технеция(VII) клетками *D. fructosovorans* (2 мМ) была выше, чем в случае *D. desulfuricans* (0.5 мМ) [91, 92]. Скорость восстановления Tc(VII) покоящихся клетками *D. fructosovorans* в отсутствие сульфата составляла 7 ммоль восстановленного технеция/г сухой биомассы в час [92], что было почти в 10 раз выше, чем у *D. desulfuricans*. С использованием экстрактов клеток и очищенной $[\text{Ni-Fe}]$ -гидрогеназы *D. fructosovorans* было показано, что в присутствии водорода Tc(VII) восстанавливается до растворимого Tc(V) или выпадает в виде нерастворимого черного осадка, в зависимости от химического состава используемого буферного раствора. В данном процессе участвует также цитохром c_3 , являющийся физиологическим акцептором электронов для гидрогеназы и реактивирующий ее. Высокая эффективность и скорость ферментативного восстановления Tc(VII) клетками *D. fructosovorans* в широком спектре температур (10–40°C) и pH (от 5.5 до 8.0) делает этот микроорганизм весьма перспективным для применения в биоремедиации сточных вод от солей технеция [92].

ВОССТАНОВЛЕНИЕ УРАНА КЛЕТКАМИ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Традиционно считалось, что наблюдаемое в природе восстановление урана в сульфидогенных зонах является неферментативным и обусловлено присутствием сульфидов [93]. Позднее было показано, что сульфид плохо восстанавливает уран [94].

Впервые способность СРБ восстанавливать уран была показана на типовом штамме *D. desulfuricans* ATCC 29577 [51]. При использовании суспензии отмытых клеток в бикарбонатном буферном растворе с лактатом или H_2 в качестве донора электронов наблюдалось быстрое уменьшение количества уранил-иона U(VI) в растворе (от 1.0 до 0.15 мМ за 3 ч) и сопутствующее ему увеличение концентрации нерастворимого уранинита U(IV) . В отсутствие донора электронов или же после термической обработки при 80°C, приводящей к гибели клеток, восстановления U(VI) не наблюдалось. Скорость ферментативного восстановления U(VI) была сравнима с таковой у железо(III)-редуцирующих бактерий и была гораздо выше скорости химического восстановления U(VI) сульфидом. Восстановленный уран имел внеклеточную локализацию; его можно было наблюдать в суспензии клеток в виде черного осадка, который состоял из U(IV) -содержащего минерала уранинита (настурана). Присутствие в растворе сульфата не оказывало значительного эффекта на восстановление U(VI) , а добавление U(VI) не изменяло скорость сульфатредукции (эти процессы осуществлялись клетками параллельно); азид и предварительная аэрация клеток также не влияли на процесс восстановления урана *D. desulfuricans*. Авторы отмечали, что способность *D. desulfuricans* к ферментативному восстановлению урана делает этот микроорганизм перспективным для применения в биоремедиации загрязненных природных вод и антропогенных отходов, в частности, это позволяет использовать хемостат при условии внесения небольших количеств сульфата для обеспечения энергетического метаболизма клеток [51].

На интактных клетках *D. desulfuricans* DSM 642, имобилизованных в полиакриламидном геле, была показана возможность ферментативного восстановления Cr(VI) , Mo(VI) , Se(VI) и U(VI) в биореакторе при их начальных концентрациях 0.5–1.0 мМ с использованием лактата или водорода в качестве донора электронов. Выпадение в осадок нерастворимых форм металлов происходило в течение 25–37 ч с эффективностью удаления из раствора 86–96% [95].

В основе ферментативного восстановления U(VI) сульфатредукторами лежит цитохром c_3 , что было показано на клетках *D. vulgaris* Hildenborough [88]. Наблюдалось восстановление U(VI)

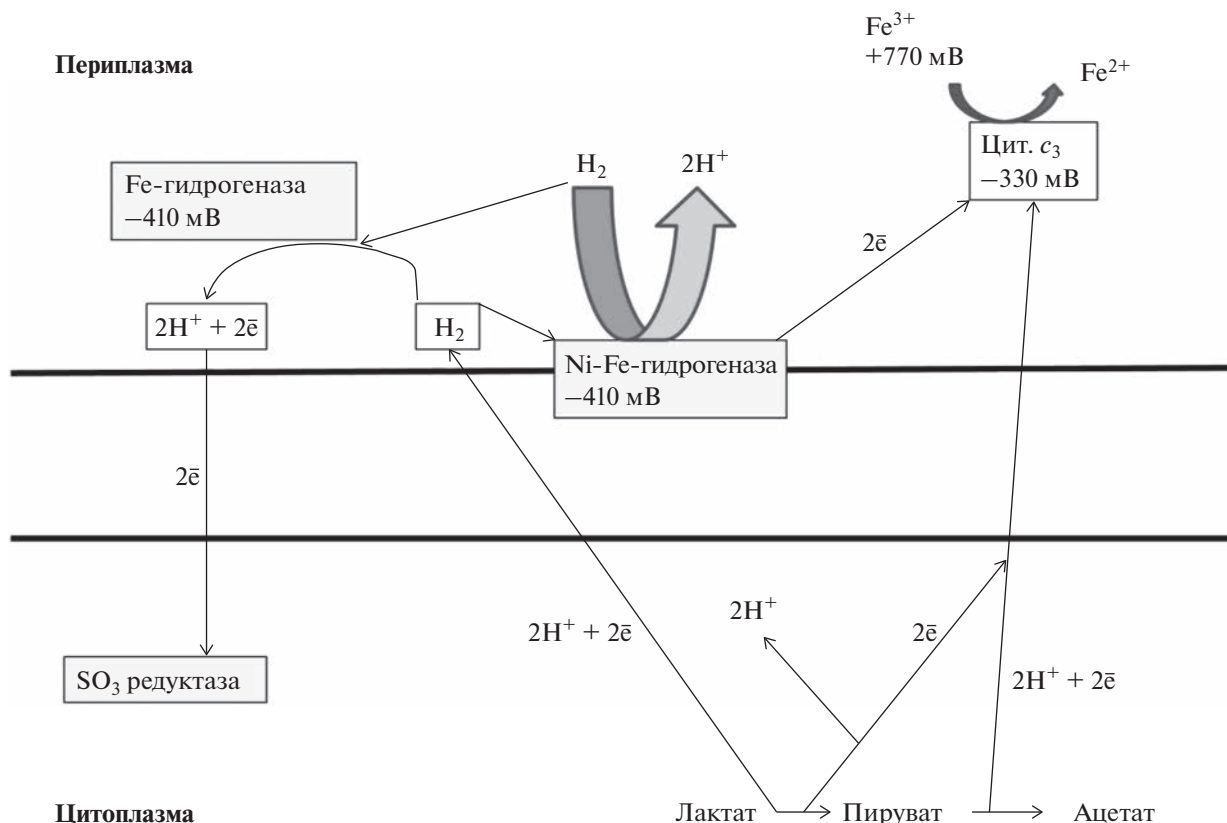


Рис. 2. Предполагаемая модель различных путей переноса электронов на сульфат с H_2 , лактата и пирувата с участием цитохрома c_3 и [Ni–Fe]-гидрогеназы [по 97].

фракцией цитохрома c_3 в присутствии H_2 и гидрогеназы. В то же время, гидрогеназа не демонстрировала способности к самостоятельному восстановлению U(VI). Быстрое восстановление U(VI) сопровождалось последующим медленным осаждением уранинита. Дальнейшие исследования в этом направлении показали, что *D. vulgaris* способен расти как при дыхании только с U(VI), так и при одновременной сульфатредукции. Биогенный сульфид неферментативно восстанавливал 76% U(VI) и значительно увеличивал общую скорость восстановления в отсутствие Fe(II). Образованные твердые вещества представляли собой нанокристаллы уранинита (UO_2), связанные с белками [96].

В 2004 г. описали детальный путь переноса электронов в процессе восстановления сульфата, Fe(III) и U(VI), объясняющий, почему данные металлы не могут обеспечивать рост СРБ [97]. Цитохром c_3 задействован в переносе электронов при окислении лактата и пирувата, но не H_2 , и одновременно представляет собой редуктазу для альтернативных акцепторов электронов с более высоким редокс-потенциалом, чем сульфат. Особое внимание в этой работе уделялось процессу трансформации клетками СРБ U(VI) в U(IV) с

высокой эффективностью, выше 90%. Однако несмотря на то, что СРБ могут выдерживать концентрации U(VI) вплоть до 24 мМ [98], большинство из них, включая *D. desulfuricans*, не способны расти с использованием U(VI) в качестве единственного акцептора электронов и нуждаются в сульфате [99]. Исключением являются *D. vulgaris* UFZ B490 [100] и *Desulfotomaculum reducens* [101]. Было предложено два альтернативных пути переноса электронов с органического донора в ЭТЦ, один из которых включает в себя цитохром c_3 , не задействованный в H_2 -зависимом восстановлении сульфата (рис. 2) [97]. Более поздние исследования показали, что в процессе восстановления U(VI) вовлечена периплазматическая [Fe–Fe], а не [Ni–Fe]-гидрогеназа, которая участвует в восстановлении растворимого Fe(III) [102].

Для *D. reducens*, клетки которого способны восстанавливать U(VI) с бутиратом или H_2 в качестве донора электронов и содержат лишь один цитохром c -типа (тригемный цитохром c_{552} , кодируемый генами *dred_0700* и *dred_0701*), была предложена гипотеза переноса электронов с участием этого цитохрома и пула хинонов на U(VI) или растворимый Fe(III) как акцепторов электронов. Изучение электронных микрофотографий

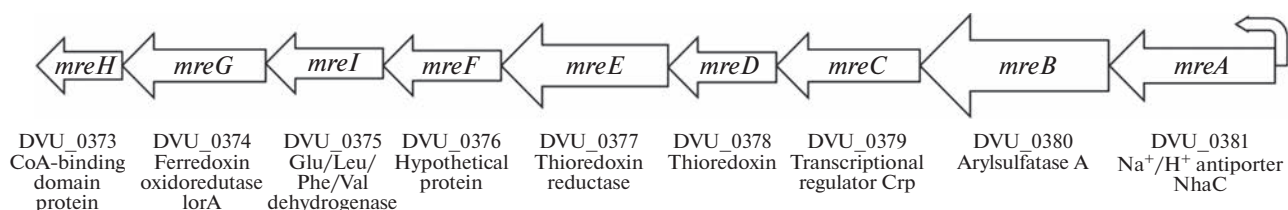


Рис. 3. Оперон *mre* сульфатредуцирующей бактерии *Desulfovibrio vulgaris*. Под каждым геном даны референтный номер кодирующей области согласно базе данных NCBI GenPept и название кодируемого белка.

D. reducens после восстановления U(VI) показало, что этот процесс ассоциирован с клеточной стенкой, поскольку аккумуляирование U(IV) происходило по обеим сторонам цитоплазматической мембраны, а цитохром *c*₅₅₂ является наружным трансмембранным белком. Связанная с мембраной [Fe–Fe]-гидрогеназа также может быть вовлечена в восстановление U(VI), перенося электроны с H₂ на цитохром *c*₅₅₂, выполняющий роль терминальной редуктазы [103].

Было также показано, что Fe(III) и U(VI) должны быть восстановлены перед началом процесса сульфатредукции; из этого можно сделать вывод, что при взаимодействии клеток СРБ с тяжелыми металлами периплазматический цитохром *c*₃ осуществляет защитную функцию, как это было ранее описано для кислородных стрессов [59], способствуя немедленному восстановлению окисленных соединений с редокс-потенциалом, превышающим таковой для сульфата (220 мВ), что предотвращает окисление макромолекул клеток [97].

Процесс восстановления урана клетками *D. desulfuricans*, как и восстановление хрома клетками *D. vulgaris* (см. выше), не ингибируется наличием в растворе сульфата и солей никеля, магния, кобальта, цинка, магния, марганца, ванадия, молибдена и селена, но существенно снижается присутствием солей меди [98].

Для изучения подвижности U(VI) в щелочных условиях, при которых минералы железа распространены повсеместно, были протестированы высокие (30 мМ) и низкие (1 мМ) концентрации карбоната, а также присутствие и отсутствие Fe(III). При высоких концентрациях карбоната (рН 9.6) восстановление U(VI) до плохо растворимого U(IV) замедлялось. В условиях с низким содержанием карбоната имеет место микробное восстановление сульфатов и накопление водного сульфида, при этом уран удалялся из раствора в виде смеси фосфатов U(IV) и U(VI). В этих условиях такие СРБ, как *Desulfosporosinus* sp., значительно увеличивали численность своей популяции. Результаты показали влияние концентрации карбонатов на образование и растворимость урана в щелочных условиях, что позволяет контролировать захо-

ронения среднеактивных отходов радионуклидов и радиоактивно загрязненные почвы [104].

УЧАСТИЕ МЕТАЛЛ-РЕДУКТАЗ И ТИОРЕДОКСИН-ТИОРЕДОКСИНРЕДУКТАЗНОЙ СИСТЕМЫ ОПЕРОНА *MRE* В ВОССТАНОВЛЕНИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И МЕТАЛЛОИДОВ

Внимание исследователей было сосредоточено, в основном, на механизмах восстановления тяжелых металлов, металлоидов и радионуклидов цитохромами *c*-типа и периплазматическими гидрогеназами СРБ. Однако изучение мутантного штамма *D. desulfuricans* G20, лишенного активности цитохрома *c*₃, показало, что при невозможности восстанавливать U(VI) с использованием H₂, клетки сохраняют способность к росту и восстановлению урана при росте на лактате [105].

Для обнаружения дополнительного механизма, вовлеченного в восстановление U(VI) клетками *D. desulfuricans* G20, методом транспозонного мутагенеза была создана библиотека мутантных клонов, которые были проверены на устойчивость к U(VI) [15]. Был получен чувствительный мутант ThioI, не способный ни к росту в присутствии 2 мМ U(VI) (а также в присутствии 100 мкМ Cr(VI) и 20 мМ As(V)) в лактат-сульфатной среде, ни к восстановлению урана и хрома в суспензии отмытых клеток. Сайт транспозонной инсерции был идентифицирован как ген, кодирующий белок-рецептор цАМФ. Остальная часть оперона *mre* (metal reduction) содержала 8 генов, по меньшей мере, три из которых (*mreG*, *mreD* и *mreE*) вовлечены в процесс восстановления U(VI), Cr(VI) и As(V). Весь оперон мутанта имел негативную регуляцию экспрессии, в том числе и при инкубации клеток с U(VI) [15]. Этот оперон (за исключением отсутствия гена *mreI*) оказался схож с опероном *mre* в геноме *D. vulgaris* Hildenborough (рис. 3).

Продукт гена *mreG* оперона *mre* был аннотирован в базе данных NCBI как белок семейства пируват:ferredоксин/флаводоксин оксидоредуктаз. Очищенная оксидоредуктаза MreG *D. desulfuricans* демонстрировала способность к восстановлению как U(VI), так и Cr(VI) в присутствии тиоредексина, тиоредексинредуктазы и НАДФН,

обеспечивая эффективный цитоплазматический механизм восстановления этих металлов [15]. Таким образом, оксидоредуктаза MreG является принципиально новой цитоплазматической металл-редуктазой в клетках СРБ.

В геноме *Desulfotomaculum reducens* были обнаружены три открытые рамки считывания, аннотированные как гены, кодирующие тиоредоксины (*dred_0762*, *dred_0904* и *dred_2669*), но только один из них (*dred_2669*) образует оперон с геном тиоредоксинредуктазы (*dred_2670*) и, предположительно, может участвовать в восстановлении U(VI) [103].

Тиоредоксин служит цитоплазматическим донором электронов для многих биологических реакций [106]. В опероне *mre* он кодируется геном *mreD*, а тиоредоксинредуктаза — геном *mreE*. Для демонстрации участия тиоредоксина в работе металл-редуктазы *mreG* клетки *D. desulfuricans* G20 инкубировали с кадмием, поскольку он оказывает специфическое ингибирующее воздействие на тиоредоксины. Добавление 20 мкМ CdCl_2 в присутствии 2 мМ U(VI) вызывало ингибирование роста *D. desulfuricans* G20 на лактат-сульфатной среде. Суспензия отмытых клеток *D. desulfuricans* G20 при добавлении CdCl_2 также теряла способность к восстановлению U(VI). Этот факт свидетельствует о важной роли тиоредоксина в восстановлении урана(VI) до урана(IV), поскольку тиоредоксин является цитоплазматическим донором электронов для металл-редуктазы *mreG* [15].

Выключение оперона *mre* приводило к потере клетками способности расти в присутствии As(V). Было высказано предположение, что арсенат-редуктаза *D. desulfuricans* также нуждается в тиоредоксине как доноре электронов [15]. Авторами были охарактеризованы функции четырех из восьми генов оперона *mre* у *D. desulfuricans* — оксидоредуктазы (*mreG*), тиоредоксина (*mreD*), тиоредоксинредуктазы (*mreE*) и промотора (*mreC*). Функции четырех других генов остаются пока выясненными не до конца. Наличие чрезвычайно сходного оперона в геноме *D. vulgaris* (рис. 3) говорит об эволюционной консервативности данной генетической структуры, обуславливающей устойчивость клеток СРБ к токсичным металлам и металлоидам [15].

Полученные данные свидетельствуют о существовании у СРБ двух различных тиоредоксин/тиоредоксинредуктазных систем — TR1/Trx1 и TR3/Trx3 [107, 108]. Они были описаны для *D. vulgaris* Hildenborough: НАДФН-зависимая TR1/Trx1-система представляет собой типичные бактериальные тиоредоксин и тиоредоксинредуктазу, но наряду с ней в клетках присутствует альтернативная НАДН-зависимая TR3/Trx3-система, сходная с TR/Trx-системой оперона *mre* *D. desulfuricans* G20 [107]. Сравнение тиоредоксинов

Trx1 и Trx3 *D. vulgaris* Hildenborough позволило обнаружить существенные различия в их строении, окислительно-восстановительных потенциалах и локализации в клетке [108]. Предполагается участие тиоредоксина Trx3 в работе металл-редуктазы, кодируемой опероном *mre*. Дальнейшее изучение этих клеточных систем способно привести к разработке эффективных методов непосредственного ферментативного восстановления неорганических токсичных соединений с помощью СРБ.

Таким образом, возможность биоремедиации от токсичных солей тяжелых металлов, металлоидов и радионуклидов с помощью СРБ представляет большой интерес как для фундаментальных, так и для прикладных исследований. Высокие скорости ферментативного восстановления целого ряда металлов, демонстрируемые многими штаммами СРБ, делают их пригодными для промышленного применения. Возможность использования в биореакторах покоящихся и иммобилизованных клеток СРБ, бионеорганических катализаторов, а также биопленок с участием смешанных культур, позволяет избежать накопления биомассы; рост бактерий на водороде и других доступных субстратах экономически выгоден и не приводит к дополнительному загрязнению стоков органическим веществом. Широкая специфичность металл-редуктазных систем СРБ и их функционирование в широком диапазоне pH (в том числе и низких) открывает большие возможности для биоремедиации шахтных и промышленных сточных вод, содержащих сразу несколько токсичных соединений металлов и металлоидов. В зависимости от окружающих условий, возможно внести необходимый минимум питательных веществ прямо в сточные воды, способствуя преимущественному развитию в них сообществ СРБ и очистке стоков *in situ*, либо использовать биореакторы, позволяющие точнее и эффективнее контролировать процессы восстановления.

Работа была выполнена в рамках гранта РФФИ 18-04-00622А “Трансформация тяжелых металлов и металлоидов сульфатредуцирующими и гетеротрофными алкалофильными бактериями”, а также госзадания по теме кафедры микробиологии МГУ “Физиология и биохимия фототрофных и хемотрофных микроорганизмов” (ЦИТиС № 121032300094-7) и госзадания ФИЦ Биотехнологии РАН (ЦИТиС № 122041100029-2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lovley D.R. // Ann. Rev. Microbiol. 1993. V. 47. P. 263–290.

2. Michel C., Brugna M., Aubert C., Bernadac A., Bruschi M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 55. № 1. P. 95–100.
3. Goulhen F., Gloter A., Guyot F., Bruschi M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 71. № 6. P. 892–897.
4. Li X., Fan M., Liu L., Chang J., Zhang J. // Water Sci. Technol. 2019. V. 80. № 12. P. 2362–2372.
5. Muyzer G., Stams A.J.M. // Nat. Rev. Microbiol. 2008. V. 6. № 6. P. 441–454.
6. Ravensschlag K., Sahn K., Knoblauch C., Jørgensen B.B., Amann R. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 3592–3602.
7. Jørgensen B.B., Findlay A.J., Pellerin A. // Front Microbiol. 2019. V. 10. article 849. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00849>
8. Minz D., Flax J.L., Green S.J., Muyzer G., Cohen Y., Wagner M., Rittmann B.E., Stahl D.A. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 10. P. 4666–4671.
9. Korneeva V.A., Pimenov N.V., Krek A.V., Tourova T.P., Bryukhanov A.L. // Microbiology. 2015. V. 84. № 2. P. 297–306.
10. Ramsing N.B., Kühl M., Jørgensen B.B. // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. № 11. P. 3840–3849.
11. Dopson M., Johnson D.B. // Environ Microbiol. 2012. V. 14. № 10. P. 2620–2631.
12. Sorokin D.Y., Cherhyh N.A. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. № 2. P. 396–401.
13. Jeanthon C., L'Haridon S., Cuffe V., Banta A., Reysenbach A.L., Prieur D. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. № 3. P. 765–772.
14. Brioukhanov A., Pieulle L., Dolla A. // Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. V. 2. / Ed. A. Mendez-Vilas. Badajoz, Formatex Research Center, 2010. P. 148–159.
15. Li X., Krumholz L.R. // J. Bacteriol. 2009. V. 191. № 15. P. 4924–4933.
16. Bradl H.B. Heavy Metals in the Environment: Origin, Interaction and Remediation. London, Elsevier / Academic Press, 2005. 269 p.
17. Herawati N., Suzuki S., Hayashi K., Rivai I.F., Koyoma H. // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2000. V. 64. № 1. P. 33–39.
18. Tokar E.J., Boyd W.A., Freedman J.H., Waalkes M.P. Toxic Effects of Metals. / Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons 8th Ed. / Ed. C.D. Klaassen. N.Y., McGraw Hill, 2013. P. 981–1030.
19. Nriagu J.O., Pacyna J.M. // Nature. 1988. V. 333. № 6169. P. 134–139.
20. Nriagu J.O. // Nature. 1989. V. 338. № 6210. P. 47–49.
21. Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K., Sutton D.J. // Exp. Suppl. 2012. V. 101. P. 133–164.
22. Kaczynski S.E., Kieber R.J. // Environ. Sci. Technol. 1993. V. 27. № 8. P. 1572–1576.
23. Richard F.C., Bourg A.C.M. // Water Res. 1991. V. 25. № 7. P. 807–816.
24. Wang Y., Su H., Gu Y., Song X., Zhao J. // Onco. Targets Ther. 2017. V. 10. P. 4065–4079.
25. Sharma D.C., Chatterjee C., Sharma C.P. // Plant Sci. 1995. V. 111. № 2. P. 145–151.
26. Venitt S., Levy L.S. // Nature. 1974. V. 250. № 5466. P. 493–495.
27. Chandra P., Sinha S., Rai U.N. In: Phytoremediation of Soil and Water Contaminants. / Eds. E.L. Kruger, T.A. Anderson, J.R. Coats. ACS Symposium Series № 664. Washington DC, American Chemical Society, 1997. P. 274–282.
28. Kotaš J., Stasicka Z. // Environ. Pollut. 2000. V. 107. № 3. P. 263–283.
29. Stein K., Schwedt G. // Fresenius' J. Anal. Chem. 1994. V. 350. P. 38–43.
30. Bernhoft R.A. // ScientificWorldJournal. 2013. ID 394652. <https://doi.org/10.1155/2013/394652>
31. Wedepohl K.H. // Geochim. Cosmochim. Acta. 1995. V. 59. № 7. P. 1217–1232.
32. Nordberg G.F., Nogawa K., Nordberg M., Friberg L. Cadmium / Handbook on the Toxicology of Metals. / Eds. G.F. Nordberg, B.F. Fowler, M. Nordberg, L. Friberg. Amsterdam, Elsevier, 2007. P. 445–486.
33. Jiang W., Fan W. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008. V. 1140. P. 446–454.
34. Stoeppel M. Arsenic / Elements and Their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis, and Biological Relevance. 2nd Ed. / Eds. E. Merian, M. Anke, M. Inhat, M. Stoeppel. Weinheim, Wiley-VCH, 2004. P. 1321–1364.
35. Rude T.R. Beiträge zur Geochemie des Arsens. / Karlsruhe Geochemische Hefte: Schriftenreihe des Instituts für Petrographie und Geochemie. 1996. V. 10. P. 206–210.
36. Smedley P.L., Kinniburgh D.G. // Appl. Geochem. 2002. V. 17. № 5. P. 517–568.
37. Sadler R., Olszowy H., Shaw G., Biloft R., Connell D. // Water Air Soil Pollut. 1994. V. 78. № 1. P. 189–198.
38. Chappell W., Beck B., Brown K., Chaney R., Cothorn C., Irgolic K., North D., Thornton I., Tsongas T. // Environ. Health Perspect. 1997. V. 105. № 10. P. 1060–1067.
39. Bissen M., Frimmel F.H. // Acta Hydrochim. Hydrobiol. 2003. V. 31. № 1. P. 9–18.
40. Tchounwou P.B., Patlolla A.K., Centeno J.A. // Toxicol. Pathol. 2003. V. 31. № 6. P. 575–588.
41. Hughes M.F. // Toxicol. Lett. 2002. V. 133. № 1. P. 1–16.
42. McNeal J.M., Balistreri L.S. Geochemistry and Occurrence of Selenium: an Overview. In: Selenium in Agriculture and the Environment. V. 23. / Ed. L.W. Jacobs. Soil Science Society of America, 1989. P. 1–13.
43. Lakin H.W. // Geol. Soc. Am. Bull. 1973. V. 83. № 1. P. 181–190.
44. Emsley J. Uranium / Nature's Building Blocks: An A to Z Guide to the Elements. / Ed. J. Emsley. Oxford, Oxford University Press, 2001. P. 476–482.
45. Arfsten D.P., Still K.R., Ritchie G.D. // Toxicol. Ind. Health. 2001. V. 17. № 5–10. P. 180–191.
46. Macaskie L.E. // Crit. Rev. Biotechnol. 1991. V. 11. № 1. P. 41–112.
47. Cataldo D.A., Garland T.R., Wildung R.E., Fellows R.J. // Health Phys. 1989. V. 57. № 2. P. 281–288.

48. Гвоздяк П.И., Могилевич Н.Ф., Рьельский А.Ф., Грущенко Н.И. // Микробиология. 1986. Т. 55. № 6. С. 962–965.
49. Yamamoto K., Kato J., Yano T., Ohtake H. // Biotechnol. Bioeng. 1993. V. 41. № 1. P. 129–133.
50. Hardoyo J.K., Ohtake H. // J. Gen. Appl. Microbiol. 1991. V. 37. P. 519–522.
51. Lovley D.R., Phillips E.J.P. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. № 3. P. 850–856.
52. Coleman M.L., Hedrick D.B., Lovley D.R., White D.C., Pye K. // Nature. 1993. V. 361. P. 436–438.
53. Lovley D.R., Phillips E.J.P. // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. № 2. P. 726–728.
54. Assfalg M., Bertini I., Bruschi M., Michel C., Turano P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. № 15. P. 9750–9754.
55. Chardin B., Giudici-Ortoni M.T., De Luca G., Guigliarelli B., Bruschi M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 63. № 3. P. 315–321.
56. Macy J.M., Santini J.M., Pauling B.V., O'Neill A.H., Sly L.I. // Arch. Microbiol. 2000. V. 173. № 1. P. 49–57.
57. Mabbett A.N., Lloyd J.R., Macaskie L.E. // Biotechnol. Bioeng. 2002. V. 79. № 4. P. 389–397.
58. Chardin B., Dolla A., Chaspoul F., Fardeau M.L., Gallice P., Bruschi M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 60. № 3. P. 352–360.
59. Cypionka H. // Annu. Rev. Microbiol. 2000. V. 54. P. 827–848.
60. Franco L.C., Steinbeisser S., Zane G.M., Wall J.D., Fields M.W. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 102. № 6. P. 2839–2850.
61. Gu W., Zheng D., Li D., Wei C., Wang X., Yang Q., Tian C., Cui M. // Chemosphere. 2021. V. 279. Article 130437. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130437>
62. Ohtake H., Cervantes C., Silver S. // J. Bacteriol. 1987. V. 169. № 8. P. 3853–3856.
63. Smith W.L., Gadd G.M. // J. Appl. Microbiol. 2000. V. 88. № 6. P. 983–991.
64. Battaglia-Brunet F., Foucher S., Denamur A., Ignatiadis I., Michel C., Morin D. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 28. № 3. P. 154–159.
65. Kim I.H., Choi J.-H., Joo J.O., Kim Y.-K., Choi J.-W., Oh B.-K. // J. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 25. № 9. P. 1542–1546.
66. Lin W.-H., Chen C.-C., Ou J.-H., Sheu Y.-T., Hou D., Kao C.-M. // Chemosphere. 2022. V. 295. Article 133877.
67. Cheung K.H., Gu J.D. // Chemosphere. 2003. V. 52. № 9. P. 1523–1529.
68. Singh R., Kumar A., Kirrolia A., Kumar R., Yadav N., Bishnoi N.R., Lohchab R.K. // Bioresour. Technol. 2011. V. 102. № 2. P. 677–682.
69. Qian J., Wei L., Liu R., Jiang F., Hao X., Chen G.-H. // Sci. Rep. 2016. V. 6. Article 23694. <https://doi.org/10.1038/srep23694>
70. Li X., Fan M., Ling Liu L., Jinghua Chang J., Jiawen Zhang J. // Water Sci. Technol. 2019. V. 80. № 12. P. 2362–2372.
71. Humphries A.C., Mikheenko I.P., Macaskie L.E. // Biotechnol. Bioeng. 2006. V. 94. № 1. P. 81–90.
72. Naz N., Young H.K., Ahmed N., Gadd G.M. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 8. P. 4610–4618.
73. Jiang Y., Zhang J., Wen Q., Zheng J., Zhang Y., Wei Q., Qin Y., Zhang X. // Biodegradation. 2022. V. 33. № 3. P. 239–253.
74. Gonçalves M.M., de Oliveira Mello L.A., da Costa A.C. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2008. V. 147. № 1–3. P. 97–105.
75. Newman D.K., Beveridge T.J., Morel F.M.M. // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. № 5. P. 2022–2028.
76. Newman D.K., Kennedy E.K., Coates J.D., Ahmann D., Ellis D.J., Lovley D.R., Morel F.M. // Arch. Microbiol. 1997. V. 168. № 5. P. 380–388.
77. Upadhyaya G., Clancy T.M., Brown J., Hayes K.F., Raskin L. // Environ. Sci. Technol. 2012. V. 46. № 21. P. 11702–11709.
78. Le Pape P., Battaglia-Brunet F., Parmentier M., Joulian C., Gassaud C., Fernandez-Rojo L., Guigner J.-M., Ikogou M., Stetten L., Olivi L., Casiot C., Morin G. // J. Hazard. Mater. 2017. V. 321. P. 764–772.
79. Sun J., Hong Y., Guo J., Yang J., Huang D., Lin Z., Jiang F. // Water Res. 2019. V. 151. P. 362–370.
80. Gao J., Zheng T., Deng Y., Jiang H. // Sci. Total Environ. 2021. V. 768. Article 144709.
81. Taylor B., Oremland R. // Curr. Microbiol. 1979. V. 3. P. 101–103.
82. Newport P.J., Nedwell D.B. // J. Appl. Bacteriol. 1988. V. 65. № 5. P. 419–423.
83. Valente F.M., Almeida C.C., Pacheco I., Carita J., Saraiva L.M., Pereira I.A. // J. Bacteriol. 2006. V. 188. № 9. P. 3228–3235.
84. Hockin S.L., Gadd G.M. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. № 12. P. 7063–7072.
85. Hockin S.L., Gadd G.M. // Environ. Microbiol. 2006. V. 8. № 5. P. 816–826.
86. Michalke K., Wickenheiser E.B., Mehring M., Hirner A.V., Hensel R. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 7. P. 2791–2796.
87. Lenz M., Van Hullebusch E.D., Hommes G., Corvini P.F., Lens P.N. // Water Res. 2008. V. 42. № 8–9. P. 2184–2194.
88. Lovley D.R., Widman P.K., Woodward J.C., Phillips E.J.P. // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. № 11. P. 3572–3576.
89. Lloyd J.R., Nolting H.F., Solé V.A., Bosecker K. // Geomicrobiol. J. 1998. V. 15. № 1. P. 45–58.
90. Lloyd J.R., Ridley J., Khizniak T., Lyalikova N.N., Macaskie L.E. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 6. P. 2691–2696.
91. Lloyd J.R., Thomas G.H., Finlay J.A., Cole J.A., Macaskie L.E. // Biotechnol. Bioeng. 1999. V. 66. № 2. P. 122–130.
92. De Luca G., de Philip P., Dermoun Z., Rousset M., Verméglio A. // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. № 10. P. 4583–4587.
93. Mohagheghi A., Updegraff D.M., Goldhaber M.B. // Geomicrobiol. J. 1985. V. 4. № 2. P. 153–173.
94. Lovley D.R., Phillips E.J.P., Gorby Y.A., Landa E.R. // Nature. 1991. V. 350. P. 413–416.

95. Tucker M.D., Barton L.L., Thomson B.M. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 20. № 1. P. 13–19.
96. Zhou C., Vannela R., Hyun S.P., Hayes K.F., E Rittmann B.E. // Environ. Sci. Technol. 2014. V. 48. № 12. P. 6928–6937.
97. Elias D.A., Suflita J.M., McInerney M.J., Krumholz L.R. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 1. P. 413–420.
98. Lovley D.R., Phillips E.J.P. // Environ. Sci. Technol. 1992. V. 26. № 11. P. 2228–2234.
99. Tucker M.D., Barton L.L., Thomson B.M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1996. V. 46. P. 74–77.
100. Pietzsch K., Hard B.C., Babel W.A. // J. Basic Microbiol. 1999. V. 39. P. 365–372.
101. Tebo B.M., Obraztsova A.Y. // FEMS Microbiol. Lett. 1998. V. 162. № 1. P. 193–198.
102. Park H.S., Lin S., Voordouw G. // Antonie Van Leeuwenhoek. 2008. V. 93. № 1–2. P. 79–85.
103. Junier P., Junier T., Podell S., Sims D.R., Detter J.C., Lykidis A., Han C.S., Wigginton N.S., Gaasterland T., Bernier-Latmani R. // Environ. Microbiol. 2010. V. 12. № 10. P. 2738–2754.
104. Townsend L.T., Kuippers G., Lloyd J.R., Natrajan L.S., Boothman C., Mosselmans J.F.W., Shaw S., Morris K. // ACS Earth Space Chem. 2021. V. 5. № 11. P. 3075–3086.
105. Payne R.B., Gentry D.M., Rapp-Giles B.J., Casalot L., Wall J.D. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 6. P. 3129–3132.
106. Holmgren A. // Ann. Rev. Biochem. 1985. V. 54. P. 237–271.
107. Pieulle L., Stocker P., Vinay M., Nouailler M., Vita N., Brasseur G., Garcin E., Sebban-Kreuzer C., Dolla A. // J. Biol. Chem. 2011. V. 286. № 10. P. 7812–7821.
108. Garcin E.B., Bornet O., Elantak L., Vita N., Pieulle L., Guerlesquin F., Sebban-Kreuzer C. // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. № 3. P. 1688–1697.

Application of Sulfate-reducing Bacteria in Bioremediation from Heavy Metals and Metalloids (Review)

A. L. Bryukhanov^a and T. V. Khijniak^{b, *}

^a Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow 119234 Russia

^b Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” RAS, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: tanya_khijniak@mail.ru

Pollution of the environment with heavy metals, metalloids and radionuclides is a global problem that seriously affects the state of the biosphere. In particular, chromium compounds have a toxic, mutagenic and carcinogenic effect. The main principle of purification of anthropogenic and natural ecosystems from chromates is the reduction of Cr(VI) to Cr(III), the salts of which are significantly less toxic and insoluble. However, currently used electrochemical and ion-exchange cleaning methods are quite expensive and require the use of special reagents. At the same time, sulfate-reducing bacteria (SRB) are of particular interest for bioremediation of this kind, since many of them are very resistant to high concentrations of heavy metals and are able to effectively reduce them in the presence of hydrogen as an electron donor. The review summarizes known data on the interaction of heavy metals, metalloids and radionuclides with SRB. The features of the metabolism of these microorganisms, leading to intracellular accumulation of heavy metals and metalloids, are considered. Complex and finely regulated enzymatic mechanisms for the reduction of toxic metals (using various cytochromes, hydrogenases, oxidoreductases, highly specific metal reductases, and thioredoxin/thioredoxin-reductase systems), as well as the possibility of using immobilized cells and biofilms of SRB in the effective bioremediation of natural waters, soils, and industrial effluents, are described.

Keywords: sulfate-reducing bacteria (SRB), bioremediation, heavy metals, metalloids, radionuclides, metal reductases