

УДК 69.035.4

А.С. Кистаубаева*, И.С. Савицкая

Факультет биологии и биотехнологии

Казахского национального университета имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

*e-mail: aida_kaz@mail.ru

Выделение почвенных тионовых бактерий и определение их биоокислительной активности

Из содово-засоленных почв Южного Казахстана выделено и идентифицировано 36 штаммов сероокисляющих бактерий. Проведен скрининг штаммов по биоокислительной (деструкция тиосульфата в сульфат) и ферментативной (тиосульфатдегидрогеназа и тиосульфатредуктаза) активности. Подобраны режимы аэрации и условия культивирования (рН, температура), обеспечивающие оптимальный урожай клеток. Штаммы могут быть использованы в технологиях биомелиорации.

Ключевые слова: Элементарная сера, окисление серы, тиобациллы, удобрение, гетеротрофные S-окисления.

А.С. Кистаубаева, И.С. Савицкая

Топырақты тионды бактерияларын

бөлу және олардың биототықтыру белсенділігін анықтау

Оңтүстік Қазақстан облысының содалы-тұздалған топырақтан 36 күкіртті тотықтырғыш бактерия штаммдары бөлініп идентификацияланды.

Биототығу бойынша штаммдардың скринингі (тиосульфаттың сульфатқа ауысу деструкциясы) және ферментативті белсенділігі анықталды. Оптималды жағдайда клетка дақылды алуға бағытталған зерттеу үрдістері, яғни аэрация және дақылдау жағдайы (рН, температура) жүргізілді.

Түйін сөздер: Күкірт, тотығу белсенділігі, тиобациллалар, тыңайтқыштар, гетеротрофты S-тотықтырғыш.

A.S. Kistaubaeva, I.S. Savickaya

The soil thiobacteria isolation and determination of their bio-oxidation activity

The Southern Kazakhstan of soda-saline soils was isolated and identified 36 strains of sulfur-oxidizing bacteria. Conducted screening of strains to bio-oxidation (destruction thiosulfate to sulfate) and enzymatic (thiosulfate dehydrogenase and thiosulfate reductase) activity. Selected modes of aeration and culture conditions (pH, temperature), providing optimum harvest cells. These strains can be used in bio-melioration technology.

Key words: elemental sulfur, oxidation activity, Thiobacilli, fertilizers, heterotrophic S-oxidizers.

Широкое распространение щелочных засоленных почв в структуре почвенного покрова Казахстана приводит к недобору урожая от 15 до 45%. Это обуславливают необходимость постоянного поиска наиболее перспективных способов их мелиорации, химическая мелиорация, т.е. внесение гипса, фосфогипса, пирита, серной кислоты, серы и отходов промышленности. Традиционные технологии химической мелиорации содово-засоленных почв (внесение гипса, фосфогипса, пирита, серной кислоты) отличаются дороговизной и низкой эффективностью [1; 2].

Одним из перспективных мелиорантов для щелочных засоленных почв может являться элементарная сера [3]. Однако, из-за инертности сера как мелиорант практически не применялась и проблемой повышения ее мелиоративной эффективности почти не занимались [4]. Следовательно, требуется разработка дополнительных приемов, повышающих окисляемость серы в почве [5; 6].

Тионовые бактерии, широко распространённые в почвах, окисляют серу до сульфатов. Образующая ими серная кислота подкисляет по-

чву, способствуя переводу некоторых важных для растений элементов в доступную форму. В связи с этим возникло новое направление в области мелиорации солонцов и щелочных почв – совместное внесение элементарной серы и тиобактерий, окисляющие серу в процессе своей жизнедеятельности [7]. Канадскими учеными была установлена высокая окисляющая эффективность (окисление 84% серы за 12 недель) культурой *Thiobacillus thioparus* [8]. В Индии также проводятся исследования возможностей использования сероокисляющих бактерий в целях повышения плодородия почв, поскольку сера может служить не только мелиорантом, но и элементом питания растений. В этих исследованиях установлено, что сера в почве с участием сероокисляющих микроорганизмов по схеме $S \rightarrow SO_2 \rightarrow SO_3$ медленно переходит в ее ди- и триоксидные формы, где последний соединяясь с водой образует серную кислоту, идеальный агент для щелочных засоленных почв. При этом мелиоративный процесс в отличие от орошений почв раствором серной кислоты протекает в «мягких» условиях [9].

Таким образом, ускорить темпы окисления элементарной серы можно путем внесения в почву биопрепаратов с почвенными сероокисляющими микроорганизмами. Причем, целесообразно использовать микроорганизмы, выделенные из содово-засоленных почв целевого региона, поскольку интродукция штаммами эндогенной микрофлоры обеспечивает их существование и функционирование в соответствующей экологической нише.

Целью исследования является получить чистые культуры сероокисляющих бактерий, определить их сероокисляющую активность и уровень накопления биомассы на селективной среде.

Материалы и методы.

Почвенные ассоциации сероокисляющих бактерий получены путем селекции из содово-засоленной почвы. Для выделения из них отдельных штаммов и изучения физиолого-биохимических и культуральных свойств использовали питательную среду Армбрустера следующего состава, г/л: $Na_2S_2O_3$ – 10; KH_2PO_4 – 4; $MgSO_4$ – 0,8; NH_4Cl – 0,4; $CaCO_3$ – 5; раствор микроэлементов – 10 мл/л. Раствор микроэлементов (г/300 мл дистиллированной воды): ЭДТА-15; $ZnSO_4$ – 0,66; $CaCl_2$ – 1,66; $MnCl_2$ – 0,75;

$CoCl_2$ – 0,15; $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ – 0,15; $FeSO_4$ – 1,5; $CuSO_4$ – 0,06; $NaOH$ – 3,3. pH питательной среды довели до 6,8 – 7,0 с помощью 10% раствора $NaHCO_3$.

Культивирование изолятов проводили на среде Баалсруда следующего состава (г/л): $Na_2S_2O_3$ – 5,0; KNO_3 – 2,0; NH_4Cl – 0,5; $NaHCO_3$ – 1,0; $MgCl_2$ – 0,5; K_2PO_4 – 2,0; $FeSO_4$ – 0,01, H_2O – 1 л, pH 7,0. Прирост биомассы сероокисляющих микроорганизмов оценивали по изменению содержания белка в культуральной жидкости методом Лоури и подсчетом количества клеток.

Процесс биологического окисления модельного субстрата (тиосульфата) при развитии сероокисляющих микроорганизмов проводили в условиях периодического культивирования в колбах на термостатируемом шейкере. Контролировали изменение концентрации субстрата – тиосульфата, а также продуктов биоокисления – сульфатов. Тиосульфат определяли методом цианолиза. Сульфат определяли на жидкостном хроматографе Biotronik LC 500. Для контроля химического окисления восстановленных соединений серы параллельно анализировали концентрацию основного субстрата в среде без внесения микроорганизмов.

Для определения активности ферментов серного метаболизма использовали бактерии конца экспоненциальной роста. Клетки отделяли от среды центрифугированием в течение 20 мин при 10 000 г дважды отмывали свежей средой, не содержащей источника энергии, затем отмывали 0,05 М трис-НСl буфером, pH 7,4. Разрушали клетки с помощью ультразвука при 22 кГц в буфере в течение 3 мин, по 1 мин с перерывами для охлаждения. Гомогенат центрифугировали 25 мин при 40 000 г и супернатант использовали для определения ферментов спектрофотометрическим или колориметрическим методами на спектрофотометре «Hitachi 200-20» (Япония).

Тиосульфатдегидрогеназу измеряли по восстановлению феррицианида при 420 нм в присутствии сульфита или тиосульфата. Активность тиосульфатредуктазы измеряли по образованию сероводорода из тиосульфата в присутствии восстановленного глутатиона и дитиотриэтола.

Результаты исследования.

Чистые культуры сероокисляющих бактерий получали из накопительных почвенных микробных ассоциаций при росте на питательной среде с тиосульфатом (источник серы) и

NH_4Cl (источник азота). В итоге изолировано 36 штаммов сероокисляющих бактерий. По результатам фенотипической идентификации бактерии были отнесены к 6 видам: *Thiobacillus thioparus*; *Thiobacillus thiooxidans*; *Thiobacillus denitrificans*; *Thiobacillus thiooxydans*; *Thiobacillus novellus*; *Thiobacillus ferrooxidans*.

Развитие всех штаммов на питательной среде с тиосульфатом характеризовалось его полной утилизацией с образованием сульфата на 8 сутки. 10 штаммов накапливали до 3900-4300 мг/дм³, КОЕ*10⁵/см³ сульфата в культуральной жидкости. При этом субстрат не обнаруживается уже на третьи сутки культивирования.

Для количественной оценки биоокислительной активности штаммов тиобацилл было осуществлено специальное исследование их ферментативной активности штаммов (табл. 1).

В процессах биоокисления тиосульфата принимают участие ферменты – дегидрогеназы, относимые к классу оксидоредуктаз. Тиосульфатдегидрогеназа и тиосульфатредуктаза являются одними из основных ферментов энергетического обмена клеток сероокисляющих микроорганизмов [9]. Наибольшее значение дегидрогеназной активности при утилизации сульфата обнаружено у 7 штаммов. (1, 5, 10, 11, 16, 24, 31 – сделать заливку для них в таблице). Высокие значения активности ферментов были достигнуты на третьи сутки культивирования, когда бактерии находились в логарифмической фазе роста, которая характеризуется интенсивным потреблением субстрата, а, следовательно, повышенной ферментативной активностью.

Следовало ожидать, что повышенная ферментативная активность будет коррелировать с уровнем урожая клеток при росте на селективной среде. Это нашло экспериментальное подтверждение (табл.2).

Урожай клеток у тех же 7 штаммов штаммов был вдвое выше, чем у штаммов со средним уровнем дегидрогеназной активности. Установлено также, что урожай клеток зависит от кислородного режима культивирования. Окисление серных соединений при увеличении содержания кислорода до 20% сопровождается возрастанием концентрации клеток в 2 раза. Наличие в среде культивирования восстановленных соединений серы также способствует значительной стабилизации культуры и увеличению урожая клеток в 1,2 раза.

Таким образом, общим итогом этого исследования является отбор наиболее активных штаммов тионовых бактерий. Это *Thiobacillus ferrooxidans* 10, 16, 24; *Thiobacillus thiooxidans* 5, 11, 31; *Thiobacillus denitrificans* 1.

Эти штаммы предполагается использовать для внесения в почву, чтобы повысить в ней уровень биоокисления серы. Для этого необходимо получить биомассу клеток. В связи с этим подбирали интервал оптимальных значений pH и температуры для культивирования. Были выбраны 2 наиболее активных штамма: *Thiobacillus thiooxidans* 31 и *Thiobacillus ferrooxidans* 10 (табл. 3).

Установлено, что оптимальный диапазон pH составляет от 6,6 до 9 единиц. Наибольший прирост биомассы в стационарной фазе роста наблюдался при pH 7. Поддержание нейтральных значений pH является обязательным требованием для эффективного накопления биомассы сероокисляющих бактерий. При понижении pH среды культивирования до 3 единиц прирост микроорганизмов минимален (25-30% в течение 5-суточного культивирования). Отмечено, что развитие тионовых бактерий при pH 9 также сопровождалось приростом биомассы. Это обстоятельство позволяет рекомендовать эти штаммы или их ассоциации для использования в качестве биопрепаратов для содово-засоленных почв.

Существенным ограничением для применения штаммов в системах мелиорации содово-засоленных почв может стать сезонное снижение температуры вплоть до 7°C в зимний период. Большинство бактерий, способных к окислению соединений серы, относятся к мезофилам. Диапазон оптимальных значений температур для сероокисляющих бактерий рода *Thiobacillus* составляет от 15 до 42°C.

В связи с сезонными колебаниями температуры в почве, анализировали рост штаммов *Thiobacillus thiooxidans* 31 и *Thiobacillus ferrooxidans* 10 в следующих температурных интервалах: 4 – 5°C, 23°C (средняя температура почвы в летний период) и 28°C (оптимальный диапазон для развития сероокисляющих бактерий рода *Thiobacillus*).

Развитие сероокисляющих микроорганизмов при температурах 23-28°C характеризовалось максимальным приростом биомассы по числу КОЕ (88-122% на 5 сутки эксперимента),

Таблица 1 - Активность ферментов серного метаболизма тионовых бактерий после 72-х часового периодического культивирования

| Штамм | Концентрация белка, мг/мл | Активность ферментов, нмоль/(мин*мг белка) | |
|-------|---------------------------|--|---------------------|
| | | Тиосульфатдегидрогеназа | Тиосульфатредуктаза |
| 1 | 130 | 1532 | 1834 |
| 5 | 100 | 1547 | 1509 |
| 10 | 150 | 1611 | 2762 |
| 11 | 105 | 1509 | 1956 |
| 13 | 60 | 929 | 1150 |
| 15 | 90 | 1207 | 1497 |
| 16 | 110 | 1394 | 2003 |
| 24 | 120 | 1592 | 2398 |
| 25 | 70 | 1023 | 1248 |
| 31 | 145 | 1603 | 2679 |

Таблица 2 - Урожай клеток (lg КОЕ/мл) бактерий рода *Thiobacillus* в условиях периодического культивирования на селективной питательной среде

| Штамм | Время культивирования, час | | | | |
|-------|----------------------------|---------|---------|---------|---------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 |
| 1 | 1,9±0,1 | 4,7±0,1 | 8±0,1 | 7,9±0,2 | 7,9±0,1 |
| 5 | 2±0,2 | 5±0,2 | 7,9±0,1 | 7,9±0,3 | 7,9±0,2 |
| 10 | 2±0,3 | 5±0,1 | 8±0,2 | 8,1±0,1 | 8,1±0,1 |
| 11 | 1,8±0,1 | 4,3±0,2 | 7,7±0,2 | 7,8±0,3 | 7,8±0,2 |
| 13 | 1,5±0,3 | 3,5±0,2 | 6±0,1 | 6,1±0,1 | 6,1±0,2 |
| 15 | 1,6±0,1 | 3±0,1 | 5,5±0,1 | 5,6±0,1 | 5,6±0,2 |
| 16 | 1,8±0,1 | 4,6±0,2 | 7,5±0,1 | 7,4±0,2 | 7,4±0,3 |
| 24 | 1,9±0,1 | 4,1±0,2 | 7,6±0,2 | 7,6±0,1 | 7,6±0,2 |
| 25 | 1,5±0,1 | 3,2±0,1 | 6,1±0,2 | 6,2±0,3 | 6,2±0,3 |
| 31 | 2±0,2 | 4,9±0,2 | 8±0,2 | 8±0,3 | 8,0±0,2 |

Таблица 3 – Изменение числа КОЕ в процессе роста сероокисляющих микроорганизмов в условиях разных значений pH питательной среды

| Время культивирования, сутки | Число КОЕх10 ⁵ /см ³ Штамм 10 | | | Число КОЕх10 ⁵ /см ³ Штамм 31 | | |
|------------------------------|--|-----------|-----------|--|-----------|-----------|
| | pH 3 | pH 7 | pH 9 | pH 3 | pH 7 | pH 9 |
| 0 | 5,17±0,72 | 6,72±1,0 | 4,48±0,58 | 5,60±0,78 | 7,36±0,72 | 5,12±0,6 |
| 1 | 5,90±0,77 | 7,36±0,88 | 5,92±0,65 | 6,18±0,87 | 7,87±0,94 | 6,30±0,6 |
| 5 | 6,48±0,71 | 12,48±0,7 | 9,78±0,67 | 7,28±0,82 | 13,06±0,5 | 10,19±0,5 |

Таблица 4 - Изменение числа КОЕ в процессе роста исследуемых ассоциаций сероокисляющих микроорганизмов в различных температурных условиях

| Время культивирования, сутки | Число КОЕх10 ⁵ /см ³ Штамм 10 | | | Число КОЕх10 ⁵ /см ³ Штамм 31 | | |
|------------------------------|--|------------|------------|--|------------|-----------|
| | 4°C | 23°C | 28°C | 4°C | 23°C | 28°C |
| 0 | 5,28±0,74 | 5,92±0,53 | 4,67±0,51 | 4,18±0,45 | 5,67±0,39 | 4,48±0,31 |
| 1 | 5,99±0,72 | 9,01±0,42 | 8,21±0,37 | 4,64±0,33 | 8,23±0,74 | 7,54±0,67 |
| 5 | 6,30±0,71 | 11,14±0,49 | 10,37±0,43 | 5,06±0,35 | 10,24±0,81 | 9,19±0,44 |

что позволяет сделать вывод о целесообразности культивирования и использования исследуемых штаммов и их ассоциаций в указанном диапазоне температур.

Таким образом, температурный фактор оказывает существенное влияние на развитие этих микроорганизмов и является одним из лимитирующих для их эффективной работы в почве (биотрансформации серы). В связи с этим, при использовании мелиоративных приемов содово-засоленных почвах с применением сероокисляющих бактерий, необходимым условием для сохранения активности бактерий является поддержание температуры на уровне 23-28°C.

Таким образом, из содово-засоленных почв выделено 36 штаммов сероокисляющих бактерий. По результатам фенотипиче-

ской идентификации они отнесены к следующим таксономическим единицам: *Thiobacillus thioparus*; *Thiobacillus thiooxidans*; *Thiobacillus denitrificans*; *Thiobacillus thiooxydans*; *Thiobacillus novellus*; *Thiobacillus ferrooxidans*.

Определена активность ферментов серного метаболизма тионовых бактерий после 72-х часового периодического культивирования. Уровень активности тиосульфатдегидрогеназы 929–1611 нмоль/(мин*мг белка). Активность тиосульфатредуктазы находится в интервале 1150–2762 нмоль/(мин*мг белка). Отобрано 7 активных штаммов.

Установлено, что наибольший прирост биомассы штаммов наблюдался на 5 сутки периодического культивирования на среде Баалсруда при pH 7,0. Температурный оптимум 23-28°C.

Литература

- 1 Follet R.H., Murphy L.S. Fertilizers and soil amendments // Prentice-Hall, Inc., Englewood cliffs – USA: New Jersey, 2001. – 557 p.
- 2 Prather R.J., Goertzen J.O., Rhoades J.D., Frenkel H. Efficient Amendment Use in Sodic Soil Reclamation. Soil Sci. Soc. Am. Journal. Vol. 42. 2008. – P. 782-786.
- 3 Bole J.B. Amelioration of a calcareous solonchic soil by irrigation, deep ripping, and acidification with elemental sulfur // Canadian Journal of Soil Science – 2006 – V.66 – P. 347-356.
- 4 Germida J. J., Janzen. H. H. Factors affecting the oxidation of elemental sulfur in soils. Nutrient Cycling in Agroecosystems. Fertilizer research. Vol. 35, Numbers 1-2, 2003. – P. 101-114.
- 5 Nor Y.M., Tabatabai M.A. Oxidation of Elemental Sulfur in Soils. Soil Sci. Soc. Am. Journal. Vol.41, 2007. – P. 736-741.
- 6 Armando G., Sergio R. The effect of chemical oxidation on the biological sulfide oxidation by an alkaliphilic sulfoxidizing bacterial consortium // Elsevier, 2007. – № 40. – P. 292-298.
- 7 McCready R.G.L. Bacterial oxidation of sulfur as a means of reclaiming solonchic soil // Solonchic Soils in Alberta (A Progress Report Alberta solonchic soils working group). –Edmonton: Alberta -2002. – P. 13-31.
- 8 McCready R.G.L., Krouse H.R.. Sulfur isotope fractionation during the oxidation of elemental sulfur by thiobacilli in a solonchic soil. // Canadian Journal of Soil Science – 2002 – V. 62 – P.105-110.
- 9 Vidyalakshmi R, Paranthaman and Bhakyari R. Sulfur Oxidizing Bacteria and Pulse Nutrition // World Journal of Agricultural Sciences – 2009 – V.5 – № 3 – P. 270-278.

Reference

- 1 Follet R.H., Murphu L.S. Fertilizers and soil amendments // Prentice-Hall, Inc., Englewood cliffs – USA: New Jersey, 2001. – 557 p.
- 2 Prather R.J., Goertzen J.O., Rhoades J.D., Frenkel H. Efficient Amendment Use in Sodic Soil Reclamation. Soil Sci. Soc. Am. Journal. Vol. 42. 2008. – R. 782-786.
- 3 Bole J.B. Amelioration of a calcareous solonchic soil by irrigation, deep ripping, and acidification with elemental sulfur // Canadian Journal of Soil Science – 2006 – V.66 – P. 347-356.
- 4 Germida J. J., Janzen. H. H. Factors affecting the oxidation of elemental sulfur in soils. Nutrient Cycling in Agroecosystems. Fertilizer research. Vol. 35, Numbers 1-2, 2003. – R. 101-114.
- 5 Nor Y.M., Tabatabai M.A. Oxidation of Elemental Sulfur in Soils. Soil Sci. Soc. Am. Journal. Vol.41, 2007. – R. 736-741.
- 6 Armando G., Sergio R. The effect of chemical oxidation on the biological sulfide oxidation by an alkaliphilic sulfoxidizing bacterial consortium // Elsevier, 2007. – # 40. – P. 292-298.
- 7 MsSready R.G.L. Bacterial oxidation of sulfur as a means of reclaiming solonchic soil // Solonchic Soils in Alberta (A Progress Report Alberta solonchic soils working group). –Edmonton: Alberta -2002. – R. 13-31.
- 8 McCready R.G.L., Krouse H.R.. Sulfur isotope fractionation during the oxidation of elemental sulfur by thiobacilli in a solonchic soil. // Canadian Journal of Soil Science – 2002 – V. 62 – P.105-110.
- 9 Vidyalakshmi R, Paranthaman and Bhakyari R. Sulfur Oxidizing Bacteria and Pulse Nutrition // World Journal of Agricultural Sciences – 2009 – V.5 – # 3 – P. 270-278.