

Национальный исследовательский
Томский государственный университет
Биологический институт
Кафедра физиологии растений и биотехнологии
МОО «Микробиологическое общество»
Общество физиологов растений России

**БИОТЕХНОЛОГИЯ, БИОИНФОРМАТИКА И ГЕНОМИКА
РАСТЕНИЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Материалы Всероссийской молодежной
научной конференции с международным участием
26–28 апреля 2016 года**

*Под редакцией
профессора О.В. Карначук*

Томск
Издательский Дом Томского государственного университета
2016

7. Lee Y.J., Romanek C.S., Wiegel J. Desulfosporosinus youngiae sp. nov., a spore forming, sulfate-reducing bacterium isolated from a constructed wetland treating acid mine drainage // Int J Syst Evol Microbiol. 2009. Vol. 59. P. 2743–2746.

8. Widdel F., Bak F. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria // The Prokaryotes / eds. A. Balows, H.G.Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer,). 2nd ed. Berlin : Springer-Verlag, 1992. Vol. 4. P. 3352–3378.

**ДОМИНИРУЮЩИЕ ФИЛОТИПЫ BACTERIA
В ОСАДКАХ И НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУРАХ,
ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ОТХОДОВ ПОЛИСУЛЬФИДНЫХ
МЕСТОРОЖДЕНИЙ ЗАБАЙКАЛЬСКОГО КРАЯ***

**А.Л. Герасимчук, Т.С. Федорова, А.В. Игошин,
Д.А. Ивасенко, О.В. Карначук**

Национальный исследовательский Томский
государственный университет, Томск, Россия

Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) – важные агенты очистки кислых шахтных дренажных вод (КШД) от тяжелых металлов. Как правило, отходы добычи сульфидных руд характеризуются низким рН и высокой концентрацией металлов. Соответственно, СРБ, используемые для очистки, должны быть устойчивы к высокой концентрации протонов и ионов металлов. Толерантные формы могут быть выделены из экосистем, ассоциированных с добычей металлов.

Целью данного исследования было получение накопительных культур СРБ из дренажных вод отходов добычи полисульфидных руд и их мониторинг методом амплификации фрагмента гена 16S рРНК и разделения их методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях (ПЦР-ДГГЭ).

* Исследование было поддержано грантом ФЦП (соглашение № 14.575.21.0067 от 07.08.2014 г. Уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI57514X0067).

Параллельно определяли доминирующие филоотипы в исходных пробах осадков.

В исследовании использовали пробы воды и осадков кислых отходов добычи металлов месторождений «Шерловая гора» (пробы ШГ-14-1, ШГ-14-3 и ШГ-14-8) и «Акатуй» (пробы ШГ-14-4, ШГ-14-5) в Забайкалье. Места отбора проб характеризовались значением pH от 2,58 до 3,19 (Шерловая гора) или околонеитральными 6,7–7,15 (Акатуй). Значения окислительно-восстановительного потенциала во всех отобранных пробах составляли от +258 до +494 мВ, что свидетельствует об окисленности осадков и воды. Элементный анализ воды выявил присутствие высоких концентраций металлов и металлоидов: алюминий (до 505 мг/л), железо (до 1916 мг/л), цинк (до 3185 мг/л), мышьяк (до 0,89 мг/л). Проба подземного водоносного горизонта ШГ-14-1 (pH 2,58) характеризовалась наиболее высоким содержанием металлов, по сравнению со всеми остальными исследованными сайтами.

Таблица 1

Описание секвенированных ДГГЭ-филоотипов 16S рРНК, выделенных из отходов добычи металлов и накопительных культур

Проба	Филоотипы, обнаруженные в пробе осадков, % сходства	Филоотипы, обнаруженные в накопительной культуре, % сходства
ШГ-14-1	<i>Desulfobulbus mediterraneus</i> , 87 <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> , 100 <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> , 99 <i>Leptospirillum ferriphilum</i> , 99 <i>Ferrimicrobium acidiphilum</i> , 100	<i>Bacteroides dorei</i> , 100 <i>Desulfosporosinus meridiei</i> , 99 <i>Desulfurispora thermophila</i> , 91
ШГ-14-2	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> , 94 <i>Acidipila rosea</i> , 96–97 <i>Ferrimicrobium acidiphilum</i> , 93	Не было сульфидогенного роста
ШГ-14-4	<i>Desulfobulbus propionicus</i> , 97 <i>Sunxiuquinia rutila</i> , 91 <i>Ferriphaseelus amnicola</i> , 95 <i>Albidiferax ferrireducens</i> , 99 <i>Sulfuritalea hydrogenivorans</i> , 98	<i>Clostridium beijerinckii</i> , 99 <i>Desulfovibrio mexicanus</i> , 98

Проба	Филотипы, обнаруженные в пробе осадков, % сходства	Филотипы, обнаруженные в накопительной культуре, % сходства
ШГ-14-5	<i>Flavobacterium segetis</i> , 99 <i>Arcticibacter pallidicorallinus</i> , 99 <i>Paludibacter propionicigenes</i> , 92 <i>Dechloromonas hortensis</i> , 98 <i>Candidatus Accumulibacter phosphatis</i> , 97–98 <i>Cytophaga fermentans</i> , 90	<i>Paludibacter propionicigenes</i> , 97 <i>Desulfovibrio mexicanus</i>, 98–99
ШГ-14-8	<i>Desulfosporosinus meridiei</i>, 99 <i>Desulfosporosinus orientis</i>, 98 <i>Desulfobulbus mediterraneus</i>, 86 <i>Ferriphaselus ammicola</i> , 96–97 <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> , 99–100	Не было сульфидогенного роста

Полужирным шрифтом выделены филотипы, родственные представителям СРБ.

Накопительные культуры СРБ получали путем посева осадка или мембранного фильтра, через который была отфильтрована вода из места отбора пробы, в жидкую пресноводную среду Видделя с добавлением разных органических субстратов (лактат, глицерол, этанол, фруктоза, ацетат, пептон) при pH от 2,5 до 5,5. Получены ацидофильные сульфидогенные культуры, способные к росту при начальных значениях pH среды 2,5 (ШГ-14-1 на этаноле, ШГ-14-4 на лактате, фруктозе и этаноле, ШГ-14-5 на пептоне и этаноле), а также ацидотолерантные сульфидогенные культуры ШГ-14-4 и ШГ-14-5, растущие при слабокислых значениях pH (4,7-5,3). Для анализа культивируемых филотипов выбраны накопительные культуры ШГ-14-1 и ШГ-14-4 на фруктозе и ШГ-14-5 на лактате, характеризующиеся наиболее активным ростом. Результаты ДГГЭ-анализа филотипов, выделенных из накопительных культур, а также из проб отходов добычи металлов, представлены в табл. 1.

В ацидофильной накопительной культуре ШГ-14-1 с фруктозой при pH 2,5 обнаружены представители спорообразующих СРБ отдела

Firmicutes, родственные *Desulfosporosinus meridiei* (99% сходства). Еще один филотип отдела *Firmicutes*, выделенный из накопительной культуры ШГ-14-1, удален от культивируемых организмов и наиболее близок спорообразующим СРБ *Desulfotomaculum gibsoniae* и *Desulfurispora thermophila* со сходством 91%. В пробе воды ШГ-14-1, откуда была выделена накопительная культура, спорообразующие СРБ не обнаружены, однако присутствовали фило типы, удаленные от культивируемых форм и наиболее близкие дельтапротеобактериальным СРБ *Desulfobulbus mediterraneus* (87% сходства). Фило типы, родственные представителям *Desulfosporosinus* и *Desulfobulbus*, присутствовали также в пробе воды ШГ-14-8, отобранной с территории того же хвостохранилища, где была получена проба ШГ-14-1. Не родственные СРБ фило типы, выделенные из проб ШГ-14-1 и ШГ-14-8, принадлежали ацидофильным железоз- и серуокисляющим бактериям (*Acidithiobacillus sp.*, *Ferrimicrobium sp.*, *Leptospirillum sp.*, *Ferriphaselus*).

Единственным фило типом СРБ, обнаруженным в пробе ШГ-14-4 хвостохранилища «Акатуй», был представитель *Desulfobulbus* (фило тип, родственный *Desulfobulbus propionicus*, 97% сходства). Хотя в культуре получить представителей этого рода не удалось, в ацидотолерантных (рН 5,5) накопительных культурах ШГ-14-4 и ШГ-14-5 детектированы фило типы другой дельтапротеобактериальной СРБ *Desulfovibrio mexicanus*. Большинство фило типов в пробах микробных обрастаний ШГ-14-4 и ШГ-14-5 месторождения «Акатуй» принадлежали ацидофильным железоз- и серуокисляющим бактериям (*Ferriphaselus sp.*, *Acidipila sp.*, *Aciditerrimonas sp.*, *Sulfuritalea sp.*), железовосстанавливающим (*Albidiferax*) и другим хемоорганотрофным микроорганизмам.

Будет продолжено выделение чистых культур СРБ из накопительных культур, полученных из проб ШГ-14-1, ШГ-14-4 и ШГ-14-5.