

ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МЕТАЛЛОВ НА СОСТАВ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ КИСЛЫХ ДРЕНАЖНЫХ ВОД МЕСТОРОЖДЕНИЯ ПОЛИМЕТАЛЛИЧЕСКИХ РУД

© 2016 г. В. В. Кадников^a, Д. А. Ивасенко^b, А. В. Белецкий^a, А. В. Марданов^a,
Э. В. Данилова^c, Н. В. Пименов^d, О. В. Карначук^b, Н. В. Равин^a, *

^aИнститут биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

^bТомский государственный университет, Россия

^cИнститут общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия

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

*e-mail: nravin@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 06.05.2016 г.

Был исследован состав микробных сообществ кислых дренажных вод двух скважин, вскрывающих террасу карьера по добыче полиметаллических руд на месторождении Шерловая Гора в Восточной Сибири. Дренажные воды скважин ShG14-1 и ShG14-8 имели близкие характеристики pH (2.6), Eh (447–494 mV) и температуры (6.5°C), но вода в первой скважине содержала больше металлов и сульфатов. В воде скважин ShG14-1 и ShG14-8 содержалось, соответственно, 1898 и 434 мг/л железа, 734 и 49 мг/мл марганца, 81 и 7 мг/л меди, 3597 и 787 мг/л цинка, 15990 и 3632 мг/л сульфата. Молекулярный анализ состава микробных сообществ проводили с помощью пиросеквенирования фрагментов гена 16S рРНК. Из числа бактерий, характерных для кислых дренажных вод, в сообществе ShG14-8 были обнаружены *Gallionella* (38.8% последовательностей генов 16S рРНК), *Ferrovum* (4.4%), *Acidiphilium* (9.1%), *Acidisphaera* (8.2%), *Acidithiobacillus* (7.2%) и *Leptospirillum* (4.6%). В образце ShG14-1 с более высоким содержанием металлов значительные доли в сообществе составляли экстремальные ацидофилы *Acidithiobacillus* (16.0%) и *Leptospirillum* (25.4%), а *Gallionella*, *Ferrovum*, *Acidiphilium* и *Acidisphaera* практически отсутствовали. Только в этом образце были обнаружены *Ferriromicrobium* (16.8%) и *Sulfobacillus* (1.4%). Таким образом, повышение концентрации металлов в дренажных водах при тех же показателях общей кислотности существенно влияло на состав микробного сообщества, исключая развитие некоторых “умеренных” ацидофилов из числа альфа- и бета-протеобактерий, при этом в сообществе начинали преобладать бактерии, характерные для дренажных вод с наиболее экстремальными значениями кислотности.

Ключевые слова: кислые шахтные воды, ацидофилы, металлы, микробное сообщество

DOI: 10.7868/S0026365616060124

Кислые шахтные дренажные воды (acid mine drainage) образуются в результате окисления и растворения пирита (FeS₂) и других сульфидных минералов в присутствии кислорода и воды. Хотя окисление пирита может происходить и абиогенно, скорость реакции увеличивается на порядки за счет активности литотрофных микроорганизмов, окисляющих восстановленные соединения серы и железа (Rohwerder et al., 2003). Процессы окисления являются причиной образования большого количества сульфатов и протонов, приводя к снижению pH среды. В условиях высокой кислотности происходит растворение содержащих металлы минералов. Кислые дренажные воды с низкими значениями pH (0.5–4) и высокими концентрациями таких металлов как железо, медь, цинк, марганец, кадмий и др. образуются в

местах складирования отходов добычи руды, затопленных шахтах и т.п.

Экстремальные физико-химические условия кислых дренажных вод ограничивают разнообразие обитающих в них микроорганизмов. Тем не менее, наличие как потенциальных доноров электронов (железо, сера и др.), так и выступающего в качестве акцептора электронов кислорода создает благоприятные условия для развития хемолитоавтотрофных микроорганизмов, являющихся первичными продуцентами в этих экосистемах. Микробные сообщества кислых шахтных дренажей активно исследовали как классическими методами микробиологии, так и молекулярными методами, основанными на детекции генов 16S рибосомной РНК (Baker, Banfield, 2003; Méndez-García et al., 2015). С использованием метагеномного анализа были определены последова-

тельности геномов микроорганизмов из кислых шахтных вод, охарактеризованы пути их метаболизма, механизмы адаптации к экстремальным условиям и биогеохимические функции (напр., Tyson et al., 2004; Baker et al., 2010; Chen et al., 2015). В кислых шахтных дренажах в основном обнаруживают представителей филумов *Proteobacteria*, *Nitrospirae*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* и *Firmicutes*. Наиболее характерными обитателями этих экосистем, часто доминирующими в условиях наиболее экстремальных pH (менее 3) и повышенной температуры (25–40°C), являются хемолитоавтотрофы — гамма-протеобактерии рода *Acidithiobacillus* и представители рода *Leptospirillum*, относящегося к филуму *Nitrospirae* (Méndez-García et al., 2015). Среди хемолитоавтотрофов в условиях умеренно низких pH (2–5) встречаются железоокисляющие бета-протеобактерии родов *Gallionella* (Bruneel et al., 2006; Fabisch et al., 2013) и *Ferrovum* (Kimura et al., 2011). Гетеротрофные бактерии кислых шахтных дренажей более разнообразны. Среди них встречаются в основном протеобактерии классов альфа, бета и гамма, а также представители филумов *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* и TM7 (Méndez-García et al., 2015).

Среди архей в кислых шахтных дренажах встречаются умеренные термофилы порядка *Thermoplasmatales* и некультивируемые линии архей с минимальным размером клеток (Archaeal Richmond Mine Nanoorganisms, ARMAN). Археи обнаруживают, как правило, в условиях экстремально низких pH (1–2) и повышенных температур (30–50°C), при этом они могут составлять значительную долю в микробном сообществе (Tyson et al., 2004).

Большое количество микробных сообществ кислых шахтных дренажей было исследовано с использованием молекулярных методов, в том числе пиросеквенирования генов 16S рРНК. Однако для кислых дренажей из рудных месторождений на территории России такие исследования не проводились. Ранее мы проанализировали метагеном микробного сообщества кислых дренажных вод в районе месторождения полиметаллических руд Шерловая Гора в Читинской области в Восточной Сибири (Кадников и соавт., 2016). Было показано, что в сообществе доминирует один микроорганизм, новый вид бета-протеобактерий рода *Gallionella*, описанный нами как *Candidatus Gallionella acididurans* ShG14-8. Анализ генома этой бактерии показал, что она, вероятно, является аэробным хемолитоавтотрофом, окисляющим Fe^{2+} и восстановленные соединения серы и фиксирующим углерод с помощью цикла Кальвина. Однако эти результаты выявили лишь доминирующие в сообществе микроорганизмы, а его минорные компоненты остаются неизвестными вследствие ограниченности объема метагеномного секвенирования.

Поэтому в этой работе мы поставили две задачи. Во-первых, провести “глубокий” молекулярный анализ таксономического состава микробных сообществ на основе пиросеквенирования фрагментов генов 16S рРНК, выявив не только доминирующие, но и минорные компоненты сообществ. Во-вторых, определить влияние на состав сообществ одного из “экстремальных” факторов, а именно, концентрации металлов, в результате сравнения состава сообществ дренажных вод из двух скважин, ShG14-1 и ShG14-8, которые имеют близкие характеристики pH, окислительно-восстановительного потенциала (Eh) и температуры, но отличаются по содержанию растворенных металлов и сульфата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб и характеристика химического состава воды. Пробы воды из скважин ShG14-1 и ShG14-8 отбирали в июле 2014 г. с помощью стерильных пластиковых бутылей. Температуру, pH и окислительно-восстановительный потенциал (Eh) определяли на месте отбора pH-метром HANNA HI 8314F. Воду для анализа содержания ионов (30 мл) и элементного анализа (15 мл) на месте отбора пропускали через фильтр с диаметром пор 0.45 мкм. Элементный анализ воды проводили в Геологической службе Великобритании и ООО “Химико-аналитический центр “Плазма” (г. Томск) методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS) и ионов на ионном хроматографе.

Выделение метагеномной ДНК, ПЦР-амплификация и пиросеквенирование фрагментов генов 16S рРНК. Для концентрирования микроорганизмов пробы воды (50 мл) фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Выделение суммарной ДНК осуществляли с использованием набора MO BIO Power Soil Kit (“MO BIO Laboratories”, Carlsbad, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для ПЦР-амплификации фрагмента гена 16S рРНК, включающего переменные участки V3–V6, использовали “универсальные” праймеры U341F (5'-CCT ACG GGR SGC AGC AG-3') и PRK806R (5'-GGA CTA CYV GGG TAT CTA AT-3'). Полученные ПЦР фрагменты секвенировали на геномном анализаторе GS FLX (“Roche”, Швейцария) по протоколу Titanium с использованием набора реактивов GS FLX Titanium Sequencing Kit XL+. Создание библиотеки, ее амплификацию и секвенирование на GS FLX проводили, следуя соответствующим протоколам фирмы “Roche”. Всего для образцов ShG14-1 и ShG14-8 было получено 4704 и 10001 последовательностей, соответственно.

Анализ результатов пиросеквенирования фрагментов генов 16S рРНК. До проведения анализа из набора определенных при пиросеквенировании

последовательностей генов 16S рРНК были удалены последовательности длиной менее 350 нт, а также содержавшие в концевых участках отличия от последовательностей праймеров. После предварительной фильтрации, в основном за счет удаления коротких прочтений, набор данных содержал 1743 последовательности для образца ShG14-1 и 4930 последовательностей для образца ShG14-8.

Затем с помощью RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>; Cole et al., 2009) последовательности были разбиты на две группы, представляющие археи и бактерии, которые в дальнейшем анализировали по отдельности. Выравнивание последовательностей проводили с использованием пакета программ Mothur (Schloss et al., 2009) и базы данных 16S рРНК SILVA (Quast et al., 2013). Затем с помощью встроенного в Mothur алгоритма Uchime (Edgar et al., 2011) были удалены потенциально химерные последовательности. Кластеризацию последовательностей проводили с помощью сервиса RDP Tools (<https://rdp.cme.msu.edu/>). Последовательности, входящие в одиночные кластеры (т.е. содержащие только одну эту последовательность) при кластерном расстоянии 0.01 исключали из дальнейшего анализа, поскольку они, в основном, представляют ошибки пиросеквенирования (Behnke et al., 2011). Финальный набор данных содержал 1396 последовательностей (1395 бактериальных и 1 архейная) для образца ShG14-1 и 4248 последовательностей (4236 бактериальных и 12 архейных) для образца ShG14-8.

Оставшиеся после фильтрации последовательности кластеризовали с помощью RDP Tools заново, для каждого полученного кластера выбирали репрезентативную нуклеотидную последовательность. Таксономическую идентификацию репрезентативных последовательностей проводили в результате их сравнения с базой данных 16S рРНК в GenBank по протоколу BLASTN. При обнаружении последовательности, имеющей более 95% сходства с геном 16S рРНК таксономически описанного микроорганизма, кластер относили к соответствующему роду.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-химические характеристики дренажных вод. Месторождение полиметаллических руд Шерловая Гора расположено на юге Читинской области в 24 км к северо-западу от районного центра Борзя. С начала XX века здесь добывали олово, используя сначала касситерит (SnO_2) купола, а в дальнейшем более глубоко залегающие полисульфиды (Banks et al., 2015). Основными рудными минералами являются пирит, пирротин, арсенопирит, халькопирит, сфалерит и галенит (Banks et al., 2015). Разработка месторождения велась открытым способом, а после прекращения

его эксплуатации в начале 1990-х годов оставшийся карьер к настоящему времени был частично заполнен озером. Объектами настоящего исследования являются неглубокие (6–18 м) скважины на восточной террасе карьера. Происхождение скважин остается неясным, это могли быть разведочные шурфы или, наиболее вероятно, неиспользованные скважины для закладки заряда при взрывных работах. Скважины ShG14-1 и ShG14-8, расположенные на расстоянии около 20 м друг от друга, имеют глубину 7.5 и 17 м соответственно, и диаметр 0.2 м. Скважины частично заполнены водой (ShG14-8 – начиная с 6 м). Источником воды может быть как инфильтрация из подземных горизонтов, на что указывает низкая температура (6.5–6.6°C), так и сток с поверхности террасы. Содержание стабильных изотопов ^2H и ^{18}O , близкое к глобальной метеорной воде, свидетельствует в пользу того, что источником воды в скважинах являются атмосферные осадки (Banks et al., 2015).

Пробы воды из обеих скважин характеризовались низким рН и высоким окислительно-восстановительным потенциалом, причем эти значения для двух скважин, как и температура, были практически одинаковыми (табл. 1). Неожиданными оказались значительные различия в концентрации растворенных ионов металлов в воде из ShG14-1 и ShG14-8. Хотя содержание железа и серы было высоким в обеих пробах, что указывает на активное окисление сульфидных минералов, концентрации этих элементов в ShG14-1 были примерно в 4–5 раз выше, чем в ShG14-8 (табл. 1). Значительно более высокие концентрации в воде из скважины ShG14-1, по сравнению с ShG14-8, наблюдались также для магния, алюминия, марганца, меди и цинка, причем концентрация последнего достигала 3.6 г/л (табл. 1). Высокая концентрация мышьяка в воде из скважины ShG14-1 (48 мг/л) согласуется с данными о высоком содержании арсенопирита в руде. Содержание ионов хлора, нитрата и нитрита в обоих образцах дренажных вод незначительное. Отметим, что вода из ShG14-8 не является просто более “разбавленным” вариантом воды из ShG14-1, что могло бы являться, например, результатом более интенсивной инфильтрации грунтовых вод, поскольку относительные концентрации различных металлов в водах этих скважин отличаются, а некоторые металлы (например, кадмий), наоборот, содержатся в ShG14-8 в более высокой концентрации (табл. 1). Возможно, скважины вскрывают различные области рудного тела, содержащие разную концентрацию сульфидов, что согласуется с разницей в глубине.

Составы микробных сообществ кислых дренажных вод по данным анализа последовательностей генов 16S рРНК. В обоих микробных сообществах абсолютное большинство микроорганизмов со-

Таблица 1. Физико-химические характеристики и элементный состав исследованных проб дренажных вод из скважин ShG14-1 и ShG14-8

Характеристика, единицы измерения	ShG14-1	ShG14-8
T, °C	6.6	6.5
pH	2.58	2.65
Eh, mV	+494	+447
Mg (мг/л)	381	151
Al (мг/л)	471	170
Fe (мг/л)	1898	434
Mn (мг/л)	734	48.7
Cu (мг/л)	80.9	6.7
Zn (мг/л)	3597	787
Cd (мг/л)	16.0	34.6
Ni (мг/л)	3.5	2.0
As (мг/л)	48.3	3.9
SO ₄ ²⁻ (мг/л)	15990	3632

ставляли бактерии, а доли архей не превышали 0.3%. Доминирующими микроорганизмами в дренажных водах скважины ShG14-1 являются хемолитоавтотрофные бактерии *Acidithiobacillus ferrivorans* (16.0% от общего числа последовательностей генов 16S рРНК) и *Leptospirillum ferrooxidans* (25.4%). *A. ferrivorans* является психрофилом, способным окислять Fe²⁺ и восстановленные соединения серы, осуществлять фиксацию CO₂ и атмосферного азота (Liljeqvist et al., 2011). Впервые *A. ferrivorans* был выделен из проб отходов добычи меди и никеля в Норильске, характеризующихся умеренно низким pH (Kupka et al., 2007), различные штаммы были выделены из кислых шахтных дренажей с pH 2–3.5 в районах с холодным климатом (Hallberg et al., 2010). *L. ferrooxidans* растет автотрофно за счет окисления железа, однако эти бактерии более типичны для дренажей с умеренными температурами (26–30°C) и экстремально низкими значениями pH (ниже 1.5), например, в шахтах Richmond mine в Калифорнии (Méndez-García et al., 2015). Третьей доминирующей в сообществе группой (16.8%) являются бактерии *Ferrimicrobium acidiphilum*, относящиеся к филуму *Actinobacteria*. Это гетеротрофы, способные окислять Fe²⁺ в аэробных условиях, а при анаэробном росте восстанавливать Fe³⁺, используя в качестве донора электронов органические соединения (Johnson et al., 2009). Культивируемые штаммы *F. acidiphilum* являются мезофилами, растущими при pH ~2. Среди других бактерий, описанных как окислители железа в кислых шахтных дренажах, в небольших количествах бы-

ли обнаружены фирмикуты родов *Sulfobacillus* (1.4%) и *Acidibacillus* (0.6%). Представители *Sulfobacillus* являются мезофилами или умеренными термофилами (~45°C) и могут расти как автотрофно, окисляя железо и серу, так и гетеротрофно (Anderson et al., 2012). Мезофилами, способными окислять железо, являются и представители рода *Acidibacillus* (Holanda et al., 2010). В целом, представители различных групп ацидофильных бактерий, способных окислять железо или восстановленные соединения серы, составляют около 60% всего микробного сообщества (табл. 2). Остальную часть составляют в основном представители различных известных групп гетеротрофных бактерий: альфа-протеобактерии порядков *Caulobacteriales*, *Sphingomonadales* и *Rhizobiales* (6.5%), бета-протеобактерии порядка *Burkholderiales* (10.5%), гамма-протеобактерии порядков *Pseudomonadales*, *Xanthomonadales* и *Oceanospirillales* (4.9%), фирмикуты порядка *Bacillales* (2.5%). Представителей некоторых из этих групп, в частности, *Sphingomonadales*, *Rhizobiales* и *Burkholderiales*, обнаруживали в кислых шахтных дренажах (Méndez-García et al., 2015). Также в образце ShG14-1 были обнаружены представители филумов *Actinobacteria* (4.9%, помимо *F. acidiphilum*), *Acidobacteria* (0.9%), *Verrucomicrobia* (0.5%), *Bacteroidetes* (0.2%) и TM7 (1.2%). Около 4.6% последовательностей генов 16S рРНК имели лишь 86% идентичности с ближайшим культивируемым представителем, *Desulfocella halophila*, и таким образом, представляли новую линию дельта-протеобактерий.

Состав микробного сообщества второго исследованного кислого дренажа, ShG14-8, существенно отличался от описанного выше. Хемолитоавтотрофные бактерии *Acidithiobacillus ferrivorans* и *Leptospirillum ferrooxidans*, являющиеся доминирующими группами в сообществе ShG14-1, присутствовали и во второй скважине, но их доли в сообществе были существенно ниже (7.2 и 4.6% соответственно). Доминирующей группой (38.8%) хемолитоавтотрофов в образце ShG14-8 является линия бета-протеобактерий рода *Gallionella*, ранее идентифицированная нами в результате метагеномного анализа этого кислого шахтного дренажа и описанная как *Candidatus Gallionella acididurans* (Кадников и соавт., 2016). Еще одной группой хемолитоавтотрофов является бета-протеобактерия *Ferroplasma muchofaciens* (4.4%). *F. muchofaciens* – психротолерантная ацидофильная (pH 2–4) бактерия, окисляющая Fe²⁺ в аэробных условиях, фиксирующая CO₂ и атмосферный азот (Johnson et al., 2014). Этот образующий микробные маты микроорганизм был идентифицирован в числе доминирующих в микробных сообществах “холодных” шахтных дренажей, например, в шахтах в северном Уэльсе (Hallberg et al., 2006; Kimura et al., 2011). Гетеротрофная часть микробного сообще-

Таблица 2. Состав микробных сообществ дренажных вод из скважин ShG14-1 и ShG14-8 по результатам анализа последовательностей генов 16S рРНК

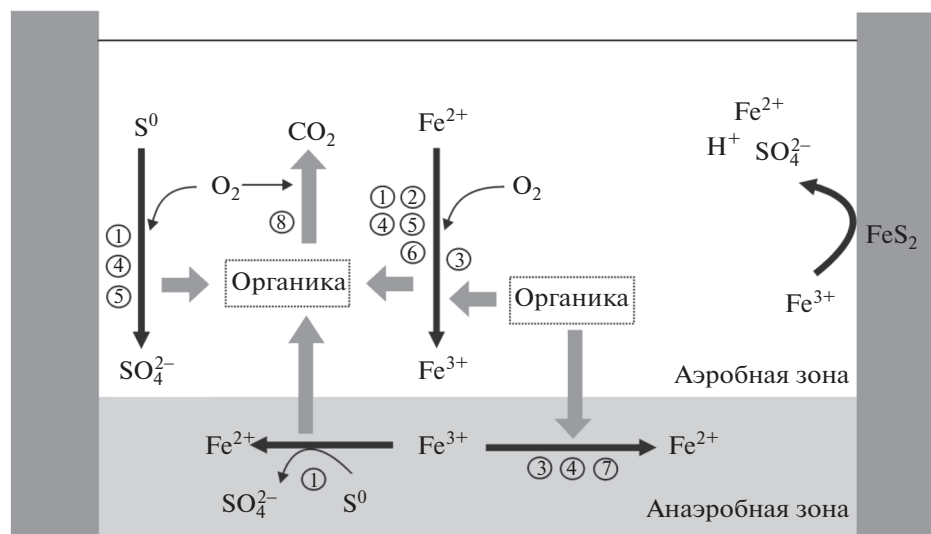
Таксономическая группа	Доля в сообществе (%)	
	ShG14-1	ShG14-8
<i>Alphaproteobacteria</i>		
<i>Acidiphilium</i>	0.5	9.14
<i>Acidisphaera</i>	—	8.26
Прочие	6.45	3.49
<i>Betaproteobacteria</i>		
<i>Gallionella</i>	—	38.8
<i>Ferrovum</i>	—	4.44
Прочие	10.5	3.38
<i>Gammaaproteobacteria</i>		
<i>Acidithiobacillus</i>	16.0	7.22
Прочие	5.52	0.33
<i>Deltaproteobacteria</i>		
Некультивируемая линия	4.59	5.62
<i>Nitrospira</i>		
<i>Leptospirillum</i>	25.4	4.56
<i>Firmicutes</i>		
<i>Sulfobacillus</i>	1.36	—
Прочие	3.08	4.49
<i>Actinobacteria</i>		
<i>Ferrimicrobium</i>	16.8	—
Прочие	4.87	3.82
<i>Acidobacteria</i>	0.93	2.27
<i>Verrucomicrobia</i>	0.50	0.66
TM7	1.15	—
Прочие бактерии и археи	2.37	3.56

ства скважины ShG14-8 также существенно отличается от ShG14-1, прежде всего, отсутствием актинобактерий рода *Ferrimicrobium*. Их место занимают альфа-протеобактерии родов *Acidiphilium* (9.1%) и *Acidisphaera* (8.3%), которые часто встречаются в кислых шахтных дренажах (Méndez-García et al., 2015). *Acidiphilium* — факультативные аэробы, которые могут восстанавливать Fe³⁺ в анаэробных условиях (Küsel et al., 1999). Культивируемые представители рода *Acidisphaera* являются аэробными хемоорганотрофами, синтезирующими бактериохлорофилл BChl_a и каротиноиды (Hiraishi et al., 2000). Среди других гетеротрофных бактерий были обнаружены те же группы, что и в образце ShG14-1, но их видовой состав и относительные доли отдельных видов отличались (табл. 2). Также в ShG14-8 была обнаружена и новая линия дельта-протеобактерий, найденная в ShG14-1, ее доля в сообществе составляла около 5.6%.

Основные группы микроорганизмов, обнаруженные в дренажных водах скважин ShG14-1 и ShG14-8, и осуществляемые ими процессы отражены на рисунке.

ОБСУЖДЕНИЕ

Высокая кислотность среды является основным фактором, ограничивающим разнообразие микробных сообществ кислых шахтных дренажей, при этом на состав сообществ влияют также такие факторы как температура, концентрации растворенных металлов, наличие источников органического углерода, содержание кислорода и другие. Хотя к настоящему времени охарактеризовано большое число микробных сообществ из различных кислых дренажей (см. обзоры Baker, Banfield, 2003; Méndez-García et al., 2015), исследуемые объекты, как правило, различаются сразу по нескольким физико-химическим параметрам. Объекты данной работы, две скважины в карьере



Основные группы микроорганизмов, обнаруженные в дренажных водах скважин ShG14-1 и ShG14-8, и осуществляемые ими процессы. Толстые серые стрелки указывают на продукцию органических веществ автотрофами и их потребление гетеротрофами. Черные стрелки указывают процессы восстановления и окисления железа и серы. Обозначения микроорганизмов: 1 – *Acidithiobacillus ferrivorans*, 2 – *Leptospirillum ferrooxidans*, 3 – *Ferrimicrobium acidiphilum*, 4 – *Sulfobacillus*, 5 – *Ca. Gallionella acididurans*, 6 – *Ferrovum tyxofaciens*, 7 – *Acidiphilium*, 8 – различные аэробные гетеротрофы. Реакция окисления пирита ионами Fe^{3+} , образуемыми при микробиологическом окислении Fe^{2+} ($\text{FeS}_2 + 14\text{Fe}^{3+} + 8\text{H}_2\text{O} > 15\text{Fe}^{2+} + 2\text{SO}_4^{2-} + 16\text{H}^+$), является абиогенной.

Шерловая Гора, имеют практически идентичные характеристики pH, температуры, окислительно-восстановительного потенциала воды, но отличаются по содержанию металлов, которое в несколько раз выше в ShG14-1, по сравнению с ShG14-8. Такие особенности позволяют выявить влияние концентрации ионов металлов на состав сообществ. В микробном сообществе скважины ShG14-8 доминирующими группами оказались бета-протеобактерии семейства *Gallionellaceae* (около 40% сообщества), а среди гетеротрофов были обнаружены альфа-протеобактерии *Acidiphilium* и *Acidisphaera*. Некультивируемые представители *Gallionellaceae* входили в число доминирующих групп микроорганизмов в образцах с умеренно-низким pH (2–5) и содержанием металлов, например, в дренажных водах шахт по добыче пирита Сае Сох в Уэльсе (Kimura et al., 2011) и Yunfu в Китае (He et al., 2007), урановой шахты Ronneburg в Германии (Fabisch et al., 2013) и др. Некультивируемая бактерия *Candidatus Gallionella acididurans* была описана как доминирующий микроорганизм сообщества ShG14-8 и при метагеномном анализе этого образца (Кадников и соавт., 2016), но проведенный в настоящей работе анализ позволил выявить большее число микробных групп микроорганизмов.

Интересно, что в образце ShG14-1 бета-протеобактерии семейства *Gallionellaceae* отсутствовали, а их место среди хемолитоавтотрофов заня-

ли *Acidithiobacillus* и *Leptospirillum*. Бактерии этих родов доминируют в шахтных дренажах с более экстремальными условиями, например, Richmond mine в Калифорнии (pH 0.5–1.5, температура 30–43°C). Изменяется и гетеротрофная часть сообщества, в которой место альфа-протеобактерий *Acidiphilium* и *Acidisphaera* занимают актинобактерии рода *Ferrimicrobium*. Таким образом, изменение содержания ионов металлов в воде является важным фактором в изменении состава микробного сообщества. Составы микробных сообществ в различных микронизах с близкими значениями pH (2.0–2.3), но отличающихся по содержанию металлов и сульфата, были охарактеризованы для шахты Сае Сох (Kimura et al., 2011). Бета-протеобактерии доминировали в образцах с меньшим содержанием железа (1.0–1.6 г/л) и сульфата (3.5–4.1 г/л), а в дренажных водах с содержанием 11 г/л железа и 10.7 г/л сульфата преобладали *Acidithiobacillus* и *Leptospirillum*, а также *Ferrimicrobium* (образцы L2, L3T и L4T из работы Kimura et al., 2011). Необходимо отметить, что состав металлов в образцах из Шерловой Горы и шахты Сае Сох существенно отличался: содержание железа в наших образцах не превышало 2 г/л, но другие металлы, в первую очередь цинк, марганец и медь, содержались в десятки раз больших концентрациях (табл. 1), чем в образцах из Сае Сох (1–5 мг/л цинка, 3–10 мг/л марганца, 0.4–1 мг/л меди, Kimura et al., 2011). Вероятно, несмотря на

различия в составе растворенных металлов, состав микробных сообществ в обоих случаях определяется общим содержанием металлов. Повышение их концентрации препятствует развитию железобактерий, вследствие чего в сообществе преобладают более устойчивые к металлам микроорганизмы – *Acidithiobacillus* и *Leptospirillum*.

Несмотря на наблюдавшиеся различия в видовом составе, в обоих исследованных нами образцах дренажных вод присутствовали одни и те же функциональные группы бактерий (рисунок). В обоих сообществах доминировали хемолитоавтотрофы, аэробно окисляющие Fe^{2+} и восстановленные соединения серы (*Acidithiobacillus ferrivorans*, *Ca. Gallionella acididurans*, *Sulfobacillus*) или только Fe^{2+} (*Leptospirillum ferrooxidans*, *Ferrovum tuhofaciens*, *Acidibacillus*). В локальных анаэробных микрозонах возможен процесс восстановления Fe^{3+} , который могут осуществлять *Acidithiobacillus ferrivorans*, использующие серу в качестве донора электронов, и гетеротрофные бактерии *Ferrimicrobium* и *Acidiphilium*. Наконец, различные аэробные гетеротрофы могут деградировать органические соединения, стимулируя рост железобактерий хемолитоавтотрофов (Bacelar-Nicolau, Johnson, 1999). Отметим почти полное отсутствие в обеих образцах архей, что может быть связано с низкой температурой исследованных дренажных вод.

Авторы выражают д-ру Дэвиду Бэнксу (Геологическая служба Великобритании) за проведение элементного анализа образцов воды. Работа выполнена с использованием научного оборудования ЦКП “Биоинженерия” при поддержке Минобрнауки (соглашение № 14.575.21.0067 от 07.08.2014, уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI57514X0067).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кадников В.В., Ивасенко Д.А., Белецкий А.В., Марданов А.В., Данилова Э.В., Пименов Н.В., Карначук О.В., Равин Н.В. Новая некультивируемая бактерия семейства *Gallionellaceae*, – описание и реконструкция генома на основе анализа метагенома микробного сообщества кислых шахтных вод // Микробиология Т. 85, № 4, С. 421–435.
- Anderson I., Chertkov O., Chen A., Saunders E., Lapidus A., Nolan M., Lucas S., Hammon N., Deshpande S., Cheng J.F., Han C., Tapia R., Goodwin L.A., Pitluck S., Liolios K., Pagani I., Ivanova N., Mikhailova N., Pati A., Palaniappan K., Land M., Pan C., Rohde M., Pukall R., Göker M., Detter J.C., Woyke T., Bristow J., Eisen J.A., Markowitz V., Hugenholz P., Kyrpides N.C., Klenk H.P., Mavromatis K. Complete genome sequence of the moderately thermophilic mineral-sulfide-oxidizing firmicute *Sulfobacillus acidophilus* type strain (NAL(T)) // Stand. Genomic Sci. 2012. V. 6. P. 1–13.
- Bacelar-Nicolau P., Johnson D.B. Leaching of pyrite by acidophilic heterotrophic iron-oxidizing bacteria in pure and mixed cultures // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 585–590.
- Baker B.J., Banfield J.F. Microbial communities in acid mine drainage // FEMS Microbiol. Ecol. 2003. V. 44. P. 139–152.
- Baker B.J., Comolli L.R., Dick G.J., Hauser L.J., Hyatt D., Dill B.D., Land M.L., Verberkmoes N.C., Hettich R.L., Banfield J.F. Enigmatic, ultrasmall, uncultivated archaea // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 8806–8811.
- Banks D., Karnachuk O.V., Kadnikov V.V., Watts M., Boyce A., Ivasenko D.A., Filenko R.A., Danilova E.V., Pimenov N.V., Gundersen P. Hydrochemical data report from sampling of polymetallic mines in Zabaikalskii Kray, eastern Siberia, Russian Federation // Norges Geologiske Undersøkelse Report. 2014.035. 102 p.
- Behnke A., Engel M., Christen R., Nebel M., Klein R.R., Stoeck T. Depicting more accurate pictures of protistan community complexity using pyrosequencing of hypervariable SSU rRNA gene regions // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. P. 340–349.
- Bruneel O., Duran R., Casiot C., Elbaz-Poulichet F., Personne J.C. Diversity of microorganisms in Fe-As-rich acid mine drainage waters of Carnoules, France // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 551–556.
- Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R.J., Kulam-Syed-Mohideen A.S., McGarrell D.M., Marsh T., Garrity G.M., Tiedje J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37. P. 141–145.
- Chen L.X., Hu M., Huang L.N., Hua Z.S., Kuang J.L., Li S.J., Shu W.S. Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses of microbial communities in acid mine drainage // ISME J. 2015. V. 9. P. 1579–1592.
- Edgar R.C., Haas B.J., Clemente J.C., Quince C., Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 2194–2200.
- Fabisch M., Beulig F., Akob D.M., Kusel K. Surprising abundance of *Gallionella*-related iron oxidizers in creek sediments at pH 4.4 or at high heavy metal concentrations // Front. Microbiol. 2013. V. 4. P. 390.
- Hallberg K.B., González-Toril E., Johnson D.B. *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments // Extremophiles. 2010. V. 14. P. 9–19.
- Hallberg K.B., Coupland K., Kimura S., Johnson D.B. Macroscopic streamer growths in acidic, metal-rich mine waters in north wales consist of novel and remarkably simple bacterial communities // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 2022–2030.
- He Z., Xiao S., Xie X., Zhong H., Hu Y., Li Q., Gao F., Li G., Liu J., Qiu G. Molecular diversity of microbial community in acid mine drainages of Yunfu sulfide mine // Extremophiles. 2007. V. 11. P. 305–314.
- Hiraishi A., Matsuzawa Y., Kanbe T., Wakao N. *Acidisphaera rubrifaciens* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-containing bacterium isolated from acidic environments // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 1539–1546.
- Holanda R., Hedrich S., Falagán C., Ñancucheo I., Dall’Agno H., Grail B.M., Johnson D.B. Characteristics of *Acidiba-*

- cillus* spp.: a novel genus of acidophilic iron-oxidising *Ferrimicrobium* // Adv. Mater. Res. 2015. V. 1130. P. 36–39.
- Johnson D.B., Bacelar-Nicolau P., Okibe N., Thomas A., Hallberg K.B. *Ferrimicrobium acidiphilum* gen. nov., sp. nov. and *Ferritrix thermotolerans* gen. nov., sp. nov.: heterotrophic, iron-oxidizing, extremely acidophilic actinobacteria // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 1082–1089.
- Johnson D.B., Hallberg K.B., Hedrich S. Uncovering a microbial enigma: isolation and characterization of the streamer-generating, iron-oxidizing, acidophilic bacterium “*Ferrofum myxofaciens*” // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. P. 672–680.
- Kimura S., Bryan C.G., Hallberg K.B., Johnson D.B. Biodiversity and geochemistry of an extremely acidic, low-temperature subterranean environment sustained by chemolithotrophy // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. P. 2092–2104.
- Kupka D., Rzhepishevska O.I., Dopson M., Lindström E.B., Karnachuk O.V., Tuovinen O.H. Bacterial oxidation of ferrous sulfate at low temperatures // Biotechnol. Bioeng. 2007. V. 97. P. 1470–1478.
- Küsel K., Dorsch T., Acker G., Stackebrandt E. Microbial reduction of Fe(III) in acidic sediments: isolation of *Acidiphilium cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe(III) to the oxidation of glucose // Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 3633–3640.
- Liljeqvist M., Valdes J., Holmes D.S., Dopson M. Draft genome of the psychrotolerant acidophile *Acidithiobacillus ferrovorans* SS3 // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 4304–4305.
- Méndez-García C., Peláez A.I., Mesa V., Sánchez J., Golyshina O.V., Ferrer M. Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats // Front. Microbiol. 2015. V. 29. P. 475.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // Nucl. Acids Res. 2013. V. 41(D1). P. D590–D596.
- Rohwerder T., Gehrke T., Kinzler K., Sand W. Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 63. P. 239–248.
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J., Sahl J.W., Stres B., Thallinger G.G., Van Horn D.J., Weber C.F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 7537–7541.
- Tyson G.W., Chapman J., Hugenholtz P., Allen E.E., Ram R.J., Richardson P.M., Solovyev V.V., Rubin E.M., Rokhsar D.S., Banfield J.F. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment // Nature. 2004. V. 428(6978). P. 37–43.

Effect of Metal Concentration on the Microbial Community in Acid Mine Drainage of a Polysulfide Ore Deposit

V. V. Kadnikov¹, D. A. Ivasenko², A. V. Beletsky¹, A. V. Mardanov¹, E. V. Danilova³,
N. V. Pimenov⁴, O. V. Karnachuk², and N. V. Ravin^{1,*}

¹Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²Tomsk State University, Tomsk, Russia

³Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, Russia

⁴Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

*e-mail: nravin@biengi.ac.ru

Received May 6, 2016

Abstract—The composition of microbial communities of acid mine drainage (AMD) in two wells drilled in the terrace of the Sherlovaya Gora open-cast polymetallic ores mine (Eastern Siberia) was studied. While drainage water filling two wells, ShG14-1 and ShG14-8, had similar values of pH (2.6), Eh (447–494 mV), and temperature (6.5°C), the water in the first well contained more metals and sulfate. The water in ShG14-1 and ShG14-8 contained, respectively, 1898 and 434 mg/L of iron, 734 and 49 mg/L of manganese, 81 and 7 mg/L of copper, 3597 and 787 mg/L of zinc, and 15990 and 3632 mg/L of sulfate. Molecular analysis of the microbial communities was performed using pyrosequencing of the 16S rRNA gene fragments. The ShG14-8 microbial community included such bacterial taxa typically found in AMD sites as *Gallionella* (38.8% of total 16S rRNA gene sequences), *Ferrofum* (4.4%), *Acidiphilium* (9.1%), *Acidisphaera* (8.2%), *Acidithiobacillus* (7.2%), and *Leptospirillum* (4.6%). In the ShG14-1 sample with higher content of metals strict acidophiles *Acidithiobacillus* (16.0%) and *Leptospirillum* (25.4%) were more abundant, while *Gallionella*, *Ferrofum*, *Acidiphilium* and *Acidisphaera* were almost absent. *Ferrimicrobium* (16.8%) and *Sulfobacillus* (1.4%) were detected in ShG14-1 but not in ShG14-8. Thus, the increase in concentration of metals in the acid mine drainage water under the same value of total acidity substantially alters the composition of the microbial community, preventing the development of “moderate” alpha- and beta-proteobacterial acidophiles, so that the community was dominated by the bacteria characteristic for the extremely acidic drainage waters.

Keywords: acid mine drainage, acidophiles, metals, microbial community