

КРАТКИЕ  
СООБЩЕНИЯ

СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ БАКТЕРИИ  
В МИКРОБНОМ СООБЩЕСТВЕ КИСЛЫХ ДРЕНАЖНЫХ ВОД  
ХВОСТОХРАНИЛИЩА МЕСТОРОЖДЕНИЯ ЗОЛОТА

© 2017 г. А. В. Марданов<sup>а, \*</sup>, А. В. Белецкий<sup>а</sup>, Д. А. Ивасенко<sup>б</sup>, Н. В. Пименов<sup>с</sup>,  
О. В. Карначук<sup>б</sup>, Н. В. Равин<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

<sup>б</sup>Томский государственный университет

<sup>с</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

\*e-mail: mardanov@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 29.09.2016 г.

DOI: 10.7868/S0026365617020148

Развитие горнодобывающей промышленности приводит к загрязнению окружающей среды такими токсичными веществами, как ионы тяжелых металлов ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и др.), которые могут мигрировать в растворенной форме. Естественным механизмом очищения экосистем является микробная сульфатредукция, в процессе которой образующийся сероводород реагирует с ионами металлов с образованием сульфидов, обладающих низкой растворимостью. Этот процесс используется как для разработки методов биоремедиации окружающей среды от тяжелых металлов, так и в биоготехнологиях их добычи (Kaksonen et al., 2008; Sánchez-Andrea et al., 2014).

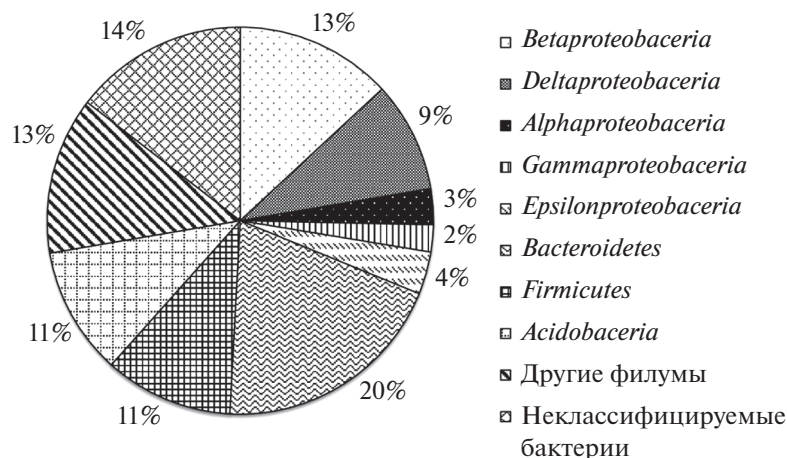
Одним из источников загрязнения окружающей среды металлами являются кислые сточные воды горнодобывающей промышленности. Кислые шахтные воды являются экстремальными экосистемами, которые характеризуются низким рН, высокой концентрацией растворенных ионов металлов и сульфата (Méndez-García et al., 2015). Сульфатредукторы встречаются среди бактерий, относящихся к классу *Deltaproteobacteria*, а также филумам *Firmicutes*, *Nitrospirae* и *Thermodesulfobacteria*, они встречаются и среди архей порядков *Archaeoglobales* и *Thermoproteales*. Хотя ацидофильные и ацидотолерантные виды редко обнаруживаются среди сульфатредуцирующих бактерий (Koschorreck, 2008), такие организмы были выявлены в кислых шахтных водах и осадках (Wielinga et al., 1999; Fortin et al., 2000; Baker, Banfield, 2003; Moreau et al., 2010; Sanchez-Andrea et al., 2012; Giloteaux et al., 2013). Однако выделить в чистые культуры, растущие при низких рН, удалось единичные виды сульфатредуцирующих бактерий, большинство из которых относятся к роду *Desulfosporosinus* филума *Firmicutes* и роду *Desulfovibrio* класса *Deltaproteobacteria* (Карначук

и соавт., 2009; Alazard et al., 2010; Abicht et al., 2011; Mardanov et al., 2016).

Объектом наших исследований является микробное сообщество дренажных вод хвостохранилища золотодобывающей шахты “Центральный” в Кемеровской области. Дренажные воды имели температуру 21°C, характеризовались низким значением рН (2.85), высоким окислительно-восстановительным потенциалом ( $E_h = +286$  mV), и содержанием металлов (211 мг/л алюминия, 22 мг/л марганца, 309 мг/л железа, 6.5 мг/л меди, 25 мг/л цинка). Ранее было продемонстрировано, что в этом микробном сообществе протекают активные процессы восстановления сульфатов (Пименов и соавт., 2014), а также была выделена ацидотолерантная сульфатредуцирующая бактерия *Desulfovibrio* sp. TomC (Karnachuk et al., 2015).

Целью этого сообщения является описание состава сульфатредуцирующих бактерий, входящих в состав микробного консорциума этих дренажных вод. Образец для метагеномного анализа, представляющий собой верхний слой осадка, был отобран в августе 2014 г. (проба Ku1).

Для определения таксономического состава микробного консорциума мы использовали метод, основанный на анализе определенных с помощью пиросеквенирования последовательностей варибельного региона V3–V6 гена 16S рРНК. Выделение ДНК, амплификацию фрагментов генов 16S рРНК с помощью универсальных праймеров и их пиросеквенирование проводили по методике, описанной в работе (Кадников и соавт., 2016). Таксономический анализ полученных последовательностей проводили с помощью RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>; Cole et al., 2009). Всего было получено 31545 последовательностей фрагментов генов 16S рРНК, прошедших фильтрацию по качеству. Из них



Состав микробного сообщества кислых дренажных вод образца Ku1. Приведена классификация на уровне филумов, для протеобактерий – на уровне классов.

99.5% относились к бактериям. Обнаруженные в небольшом количестве археи были представлены одной “некультивируемой” линией, ранее выявленной по 16S рРНК в дренажных водах и осадках (например, GenBank KM273521).

В исследуемом микробном консорциуме образца Ku1 доминировали бактерии четырех филумов (рис. 1): *Proteobacteria* (31.0%), *Bacteroidetes* (20%), *Firmicutes* (11%) и *Acidobacteria* (11%), которые широко распространены в различных кислых шахтных водах (Méndez-García et al., 2015). Минорная часть бактериального сообщества разнообразна и включает в себя представителей филумов *Actinobacteria*, *Ignavibacteria*, *Spirochaetes*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia*, *Saccharibacteria* (TM7) и др. Около 14% последовательностей фрагментов генов 16S рРНК бактерий относятся к “некультивируемым” линиям, которые не удается классифицировать даже на уровне филума.

Полученные данные показывают, что ранее обнаруженный нами процесс сульфатредукции может осуществляться, в первую очередь, дельта-протеобактериями, которые составляют около 9% сообщества. Среди них были обнаружены известные сульфатредукторы родов *Desulfobulbus* (0.34%), *Desulfopila* (0.62%), *Desulfovibrio* (0.5%), *Desulfobacca* (0.01%), *Desulfomonile* (0.07%), *Desulfoprunum* (0.02%), *Desulfonatronobacter* (0.08%), *Desulfatirhabdium* (0.12%). Около 2.9% составляли представители порядка *Desulfobacteriales*, которых не удалось классифицировать на уровне рода. Дополнительно была обнаружена вторая группа сульфатредуцирующих бактерий, относящаяся к филуму *Firmicutes* и представленная родом *Desulfosporosinus* (1% микроорганизмов).

Обнаружение сульфатредукторов, относящихся к дельта-протеобактериям и фирмикутам, также согласуется с результатами анализа метагенома

образца Ku1 (наши неопубликованные данные). В этом метагеноме было обнаружено несколько наборов генов, кодирующих ферменты пути диссимиляционной сульфатредукции. Большинство из них имели гомологию с соответствующими генами дельта-протеобактерий, что указывает на ключевую роль этих микроорганизмов в процессе сульфатредукции в исследуемом кислом шахтном дренаже.

Таким образом, исследуемое микробное сообщество является перспективным для поиска новых ацидофильных сульфатредуцирующих бактерий, которые могут быть использованы для разработки биотехнологий извлечения металлов и биоремедиации.

Работа выполнена с использованием научного оборудования ЦКП “Биоинженерия” при поддержке Минобрнауки (соглашение № 14.604.21.0108, уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60414X0108).

## 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. Влияние содержания металлов на состав микробных сообществ кислых дренажных вод месторождения полиметаллических руд // Микробиология. 2016. Т. 85. № 6. С. 732–739.
- Kadnikov V.V., Ivashenko D.A., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Danilova E.V., Pimenov N.V., Karnachuk O.V., Ravin, N.V. Effect of metal concentration on the microbial community in acid mine drainage of a polysulfide ore deposit // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. № 6. P. 732–739.
- Карначук О.В., Герасимчук А.Л., Бэнкс Д., Френгстадт Б., Стыков Г.А., Тихонова Э.Л., Каксонен А.Х., Пухакка Я.А., Яненко А.С., Пименов Н.В. Бактерии цикла серы в осадках хвостохранилища добычи золота в Кузбассе // Микробиология. 2009. Т. 78. № 4. С. 535–544.

- Karnachuk O.V., Gerasimchuk A.L., Stykon G.A., Tikhonova Z.L., Banks D., Frengstad B., Kaksonen A., Puhakka J., Yanenko A.S., Pimenov N.V.* Bacteria of the sulfur cycle in the sediments of gold mine tailings, Kuznetsk Basin, Russia // *Microbiology*. 2009. V. 78. P. 483–491.
- Пименов Н.В., Ивасенко Д.А., Герасимчук А.Л., Захарова Е.Е., Марданов А.В., Карначук О.В.* Активный процесс сульфатредукции в кислых осадках хвостохранилища добычи золота // *Микробиология*. 2015. Т. 84. № 3. С. 386–388.
- Pimenov N.V., Zakharova E.E., Ivasenko D.A., Gerasimchuk A.L., Karnachuk O.V., Mardanov A.V.* Active sulfate reduction in acidic sediments of gold mine tailings // *Microbiology*. 2015. V. 84. P. 453–455.
- Abicht H.K., Mancini S., Karnachuk O.V., Solioz M.* Genome sequence of *Desulfosporosinus* sp. OT, an acidophilic sulfate-reducing bacterium from copper mining waste in Norilsk, Northern Siberia // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. P. 6104–6105.
- Alazard D., Joseph M., Battaglia-Brunet F., Cayol J.-L., Olivier B.* *Desulfosporosinus acidiphilus* sp. nov.: a moderately acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acid mining drainage sediments // *Extremophile*. 2010. V. 14. P. 305–312.
- Baker B.J., Banfield J.F.* Microbial communities in acid mine drainage // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2003. V. 44. P. 139–152.
- 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 // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. 141–145.
- Fortin D., Roy M., Rioux J., Thibault P.* Occurrence of sulfate-reducing bacteria under a wide range of physico-chemical conditions in Au and Cu-Zn mine tailings // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2000. V. 33. P. 197–208.
- Giloteaux L., Duran R., Casiot C., Bruneel O., Elbaz-Poulichet F., Goni-Urriza M.* Three-year survey of sulfate-reducing bacteria community structure in Carnoules acid mine drainage (France), highly contaminated by arsenic // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2013. V. 83. P. 724–737.
- Kaksonen A.H., Dopson M., Karnachuk O.V., Tuovinen O.V., Puhakka J.A.* Biological iron oxidation and sulfate reduction in the treatment of acid mine drainage at low temperatures // *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology* / Eds. Margesin R. et al. Berlin: Springer, 2008. P. 429–454.
- Karnachuk O.V., Mardanov A.V., Avakyan M.R., Kadnikov V.V., Vlasova M., Beletsky A.V., Gerasimchuk A.L., Ravin N.V.* Draft genome sequence of the first acid-tolerant sulfate-reducing delta-proteobacterium *Desulfovibrio* sp. TomC having potential for minewater treatment // *FEMS Microbiol. Lett.* 2015. V. 362. P. 1–3.
- Koschorreck M.* Microbial sulphate reduction at a low pH // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2008. V. 64. P. 329–342.
- Mardanov A.V., Panova I.A., Beletsky A.V., Avakyan M.R., Kadnikov V.V., Antsiferov D.V., Banks D., Frank Y.A., Pimenov N.V., Ravin N.V., Karnachuk O.V.* Genomic insights into a new acidophilic, copper-resistant *Desulfosporosinus* isolate from the oxidized tailings area of an abandoned gold mine // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2016. V. 92(8): fiw111.
- 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(6). P. 475.
- Moreau J.W., Zierenberg R.A., Banfield J.F.* Diversity of dissimilatory sulfite reductase genes (*dsrAB*) in a salt marsh impacted by long-term acid mine drainage // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. P. 4819–4828.
- Sanchez-Andrea I., Rojas-Ojeda P., Amils R., Sanz J.L.* Screening of anaerobic activities in sediments of an acidic environment: Tinto River // *Extremophiles*. 2012. V. 16. P. 829–839.
- Sánchez-Andrea I., Sanz J.L., Bijmans M.F.M., Stams A.J.M.* Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage // *J. Haz. Mater.* 2014. V. 269. P. 98–109.
- Wielinga B., Lucy J.K., Moore J.N., Seastone O.F., Gannon J.E.* Microbiological and geochemical characterization of fluvially deposited sulfidic Mine tailings // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. P. 1548–1555.