

УДК 577.29

## ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ПРИ ОЦЕНКЕ СОСТАВА СООБЩЕСТВ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕСТОРОЖДЕНИЯ «ШАНУЧ» (КАМЧАТКА)

С. В. Рогатых, И. А. Кофиади, С. В. Мурадов, А. А. Балыков

Научно-исследовательский геотехнологический центр ДВО РАН,  
г. Петропавловск-Камчатский  
E-mail: Rogatykhsv@yandex.ru

Впервые изучен качественный и количественный состав сообществ хемолитотрофных ацидофильных микроорганизмов сульфидных руд месторождения «Шануч» с применением молекулярно-генетических подходов. С помощью разработанной модели проведена оценка эффективности основных методик очистки ДНК хемолитотрофных микроорганизмов. При проведении молекулярного анализа структуры сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов рекомендована модифицированная методика, основанная на лизирующей активности гуанидин изотиоцианата с последующей очисткой фенолом и хлороформом. По результатам анализа библиотеки клонов исследуемого сообщества показано, что подавляющее большинство нуклеотидных последовательностей принадлежит представителям рода *Acidithiobacillus*. Обнаружено наличие последовательностей альфапротеобактерий семейства *Acetobacteriaceae*, бактерии *Acidiphilium* sp., архей *Thermococcus* sp. и *Ferroplasma* sp.

**Ключевые слова:** месторождение «Шануч», полимеразная цепная реакция, хемолитотрофные микроорганизмы, библиотека нуклеотидных последовательностей.

### ВВЕДЕНИЕ

Микробное выщелачивание сульфидных руд и концентратов давно признано привлекательной альтернативой традиционным физическим и химическим методам извлечения металлов из руд благодаря его экологичности – сокращению потребления энергии и транспортных затрат, менее пагубному воздействию на окружающую среду (Nap, 1998). В настоящее время различными компаниями России, стран Северной и Южной Америки, Африки, Австралии используются бактериально-химические технологии переработки меди, кобальта, никеля, золота, цинка, урана (Rawlings, 1998; Brierley, Brierley, 2001; Ehrlich, 2001; Breed et al., 2000 и др.). Вопросам изучения процессов бактериально-химического выщелачивания посвящены многие работы отечественных и зарубежных ученых.

Горнодобывающая отрасль в связи с истощением запасов высокообогащенных руд направлена на перспективу промышленного использования микроорганизмов для своих нужд. Видовое разнообразие и количественное соотношение видов ацидофильных хемолитотрофных микроорганиз-

мов, принимающих участие в биовыщелачивании сульфидных руд, является одной из актуальных проблем в современной биогеотехнологии.

Камчатский регион обладает высоким минерально-сырьевым потенциалом. Месторождение «Шануч» на западе Камчатки содержит сульфидные медно-никелевые руды (содержащие в среднем 5% никеля, менее 1% меди и кобальта), являющиеся ценным объектом для переработки (Левенец, 2012). Поиск технологий, включающих экономичность процесса и экологизацию производства, – еще нерешенная проблема развития горнопромышленного комплекса Камчатского края.

До недавнего времени видовой анализ микроорганизмов в процессе выщелачивания проводили с помощью культуральных, микроскопических, биохимических методов. В настоящее время определение видового состава сообществ ведется, как правило, с использованием молекулярно-генетических методов, основанных на полиморфизме длин рестрикционных фрагментов ДНК или гибридизационного ДНК-анализа *in situ*. Однако эти методы не позволяют проводить количественную оценку состава сообществ, пробоподготовка занимает много времени, методы сложны и ресурсоемки.

Одним из наиболее перспективных подходов к изучению видового разнообразия микроорганизмов является анализ последовательностей их ДНК. В настоящем исследовании реализована модификация метода полимеразной цепной реакции (основы большинства методов генодиагностики микроорганизмов), основанная на использовании флуоресцентной детекции продуктов реакции – ПЦР в реальном времени.

Современная модификация метода ПЦР, реализованная в работе, подходит как для качественного, так и для количественного анализа. Метод прост в применении и обладает рядом преимуществ, определяющих его максимальную приспособленность для нужд экологического мониторинга в культуральной среде бактериальных сообществ ацидофильных хемолитотрофов – возможность выявления даже нескольких копий генома бактерий в образце и, как следствие, максимальная диагностическая мощность; чувствительность и специфичность, достигающие 100%, высокая воспроизводимость; сжатые сроки исследования; умеренная и постоянно снижающаяся себестоимость. Аналоги данной методики реализованы при идентификации ацидофильных хемолитотрофов в процессах биовыщелачивания за рубежом, в частности в КНР (Bowe et al., 2009).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы чистые культуры *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* и *Ferroplasma acidiphilum*, предоставленные лабораторией хемолитотрофных микроорганизмов Института микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН, а также образцы смешанных культур автохтонных сообществ хемолитотрофных микроорганизмов, выделенных из окисленной и неокисленной руды кобальт-медно-никелевого месторождения «Шануч» (Камчатка), предоставленные сотрудниками лаборатории геохимии и геотехнологии НИГТЦ ДВО РАН. Выделение микроорганизмов осуществляли классическими методами, выращивали на среде Сильвермана–Люднгрена 9К без железа и, в случае с железоокисляющими бактериями, на той же среде с железом (Каравайко и др., 1989) в лабораторных реакторах. В сравнении принимали участие два типа проб: содержащие микроорганизмы, прикрепленные к частицам руды, и содержащие преимущественно свободные клетки. В общей сложности проанализировано около 170 проб.

Выделение ДНК осуществляли по методике, описанной ранее (Рогатых и др., 2011). Для оценки видового состава проб использовали метод молекулярного клонирования с дальнейшим определением последовательности целевой вставки.

Клонирование проводилось в ООО «Евроген» (Москва) с использованием вектора pGemTeasy. В качестве клонируемого фрагмента использован ПЦР-продукт, полученный при амплификации специфического участка гена 16S рРНК с помощью универсальных праймеров *cp2-d* и *cp3-g*. Для анализа библиотеки клонов было отобрано 100 колоний, содержащих вставку ПЦР-продукта, полученного с помощью данных праймеров. Определение последовательности целевой вставки проводили методом секвенирования по Сэнгеру (Sanger, Coulson, 1975).

Для мечения продуктов использовали один из комплементарных праймеров и набор меченых дидезоксирибонуклеотидтрифосфатов (BigDye Terminator Kit, Applied Biosystems, США). Реакцию проводили в амплификаторе «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Россия) по следующей программе: 94°C – 10 с, 56°C – 20 с, 72°C – 20 с в течение 40 циклов. Дальнейшая подготовка продукта для проведения реакции секвенирования включала химическую денатурацию матрицы с помощью денатурирующего буфера TSR (Template Suppression Reagent, Applied Biosystems, США) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Секвенирование проводили с помощью автоматического секвенатора ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) согласно рекомендациям производителя.

Определение качественного и количественного состава микробных сообществ проводили методом ПЦР с детекцией накопления продуктов реакции. Каждый образец тестировали в двух повторностях. Визуализацию накопления продуктов ПЦР проводили с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I. ПЦР проводили в детектирующем амплификаторе ДТ-96 (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Россия) по следующей программе: 94°C – 10 с, 64°C – 20 с, 72°C – 10 с в течение 40 циклов, с измерением флуоресценции при 64°C.

Опытным путем были выбраны системы олигонуклеотидов, определен состав реакционного буфера и оптимизированы условия проведения ПЦР. Оптимальную температуру отжига праймеров определяли постановкой ПЦР с температурой отжига праймеров в диапазоне 60–72°C с последующей оценкой количества ПЦР продукта методом агарозного гель-электрофореза. Эффективность ПЦР определяли методом серийных разведений, с построением нормировочной кривой, а также с помощью программного обеспечения ДТ-96.

Выравнивание последовательностей проводили с помощью алгоритма *ClustalW* ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) и программы *Seqman* (DNASTar). Принадлежность к определенному флотипу определяли

по принципу идентичности 97%-ной последовательности с использованием программного обеспечения *FastGroup II*.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки качественного и количественного состава сообществ хемолитотрофных микроорганизмов, принимающих участие в биовыщелачивании, использовался следующий комплекс молекулярно-генетических подходов: выделение и очистка нуклеиновых кислот хемолитотрофных ацидофильных микроорганизмов, очистка плазмидной ДНК, построение библиотеки клонированных фрагментов гена 16S рРНК, определение нуклеотидной последовательности выделенной ДНК, агарозный гель-электрофорез, полимеразная цепная реакция в реальном времени.

Результатом первого этапа работы стала разработка универсальных праймеров, позволяющих амплифицировать фрагмент генома всех бактерий и архей, входящих в состав микробного сообщества. Этот фрагмент содержит участки, которые используются в качестве маркеров при идентификации видов. При этом эффективность амплификации выбранного фрагмента в данном случае определяет аналитическую чувствительность метода ПЦР, поскольку предпочтительная амплификация основного типа последовательностей может привести к потере информации о слабо представленных микроорганизмах и искажению результатов анализа.

В сравнении принимали участие 8 пар праймеров (см. таблицу). Универсальность праймеров была проверена более чем на 5000 последовательностей бактерий и архей. Для оценки наличия продуктов неспецифической амплификации и димеров праймеров, а также выбора праймеров, по-

зволяющих получить более короткие продукты амплификации, проведен электрофорез на образцах ДНК, выделенной из реакторных проб, культивируемых в лаборатории геохимии и геотехнологии НИГТЦ ДВО РАН. По результатам обработки баз данных и экспериментальным данным, наилучший результат дала пара праймеров *upr2-d* и *upr3-r*.

Для проверки выбранных праймеров *upr2-d* и *upr3-r* была проведена ПЦР в реальном времени на ДНК, выделенной из чистых линий культур *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *S. thermosulfidooxidans* и *F. acidiphilum*, результаты которой приведены на рисунке. Выбранные праймеры показали свою специфичность в отношении каждого представителя микроорганизмов.

Эффективность полимеразной цепной реакции была проверена методом построения стандартной кривой. Для этого использованы серии десятикратных разведений препаратов ДНК, полученных из чистых культур *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *S. thermosulfidooxidans* и *F. acidiphilum* в качестве образцов. Четыре разведения каждого из тестируемых образцов были протестированы в трех повторностях. Десятичные логарифмы относительных значений концентрации были нанесены на график против значений *C<sub>t</sub>* (точка пересечения кривой накопления продукта ПЦР с произвольно установленным пороговым уровнем, превышающим уровень шумов). В данном случае эффективность ПЦР зависит только от угла наклона кривой, поэтому абсолютные значения концентрации ДНК не требуются (Ребриков и др., 2009). Расчеты эффективности ПЦР с использованием программного обеспечения ДТ-96 показали, что эффективность составила  $\geq 93\%$ .

На следующем этапе исследования – анализ библиотеки клонов отсекаемых фрагментов гена 16S рРНК хемолитотрофных микроорганизмов – были охарактеризованы структура и состав накопительных культур микроорганизмов, полученных из биореакторов НИГТЦ ДВО РАН. Для этого был использован подход с построением библиотеки бактериальных клонов, содержащих специфические вставки фрагмента гена 16S рРНК бактерий и архей. Анализ нуклеотидных последовательностей позволяет установить качественный состав смешанных сообществ микроорганизмов на уровне родов, однако в силу ограничений метода определение до вида, как правило, затруднено. Кроме того, при условии удачно подобранных универсальных праймеров по числу последовательностей разных риботипов можно судить о количественном соотношении микроорганизмов в сообществе.

В составе библиотеки было получено и проанализировано 93 клон. Все последовательности генов 16S рРНК были сгруппированы в пять риботипов, относящихся к четырем известным

#### Последовательности праймеров, использованных в работе

##### Primer sequences used in the current work

Название	Последовательность 5'-3'
<i>upr1-d</i>	GTGCCAGCHGCCGCGGTA
<i>upr2-d</i>	TGCATGGCYGTCGTCAGCTCGT
<i>upr2-r</i>	ACGAGCTGACGACRGCCATGCA
<i>upr3-r</i>	TGACGGGCGGTGTGTRCAAGG
<i>upr4-r</i>	TGGTTTGACGSGCGGTGTGT
<i>bac2-d</i>	ATTAGATACCCBGGTAGTCC
1427-r	TACCTTGTACGACTTMAACC
<i>AtF</i>	TCTTCGGACCTCGCGCTGG
<i>AtR</i>	GTCAACAGCAGGCGATATTAGCAC
<i>AjF</i>	AATCTGCTATTGACGTGAATCC
<i>AjR</i>	CATGAACCATACCGTGGTAAC
<i>Fer-d</i>	CCTGAAGCTTAACCTCAGAAAGT
<i>Fer-r1</i>	TCTTTGTAATGCGCGTGTAGC
<i>Sulf-d1</i>	ACCTTCGGGTCAGCGGCGG
<i>Sulf-r</i>	GCCGGTCTTCGTCCCGACA

родам, а также в одну группу сходных последовательностей, классифицируемых до семейства. Группировку последовательностей проводили с помощью он-лайн алгоритма FastGroupII по принципу процентного соотношения идентичных последовательностей для двух анализируемых клонов. За пороговый уровень сходства последовательностей было принято значение 97%.

Установлено, что подавляющее большинство нуклеотидных последовательностей (92%) принадлежит представителям рода *Acidithiobacillus*. Уровень сходства последовательностей, формирующих данный риботип, был достаточно высок (более 98%) и не позволил провести более точный анализ в пределах группы. Помимо бактерий рода *Acidithiobacillus* было обнаружено три последовательности альфапротеобактерий семейства Acetobacteriaceae. Для двух из них не удалось определить родовую принадлежность (некультивируемые ацетобактерии). Единственная последовательность, на основании которой удалось классифицировать микроорганизм до рода, принадлежала бактерии *Acidiphilium* sp. (класс Alphaproteobacteria, порядок Rhodospirillales, семейство Acetobacteriaceae). Кроме того, в составе сообщества было обнаружено три последовательности, принадлежащие археям типа *Euryarchaeota*: две из них были классифицированы как *Thermococcus* sp. (класс Thermococci, порядок Thermococcales, семейство Thermococcaceae) и одна как *Ferroplasma* sp. (класс *Thermoplasmata*, порядок *Thermoplasmatales*, семейство *Ferroplasmaceae*).

С помощью морфологических и культуральных методов установлено, что основными аборигенными для месторождения «Шануч» микроорганизмами являются бактерии *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *S. thermosulfidooxidans* и *F. acidiphilum* (Кузякина и др., 2008). Однако эти данные не дают представления о количественном составе сообществ, а также не позволяют дифференцировать близкородственные и морфологически не различающиеся виды. Для решения задачи качественного и количественного анализа сообществ нами был разработан комплекс ПЦР тест-систем с возможностью детекции результатов реакции в режиме реального времени.

Тест-системы были подобраны таким образом, чтобы достоверно выявлять четыре вида бактерий, принимающих участие в процессе биовыщелачивания: *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *S. thermosulfidooxidans* и *F. acidiphilum*. Последовательности генома были получены из открытых баз данных последовательностей ДНК и экспериментально. Были синтезированы два универсальных праймера, располагающихся в консервативных участках последовательностей. Учас-

тки, амплифицируемые с помощью этих праймеров, составляли 420 п. н. в длину и содержали несколько высоковариабельных доменов. Эти домены были впоследствии использованы для подбора мест отжига видоспецифичных праймеров.

С помощью интернет-баз данных, содержащих известные последовательности ДНК, было выявлено, что универсальные праймеры соответствуют последовательностям 16S рДНК многих бактерий и архей, в то время как специфические праймеры обладают высокой специфичностью на видовом уровне. Системы праймеров в эксперименте показали высокую специфичность и точность. Результаты воспроизводимы на культурах бактерий – данные тест-системы в настоящее время применяются в экспериментальных работах по выявлению наиболее эффективных в выщелачивании сообществ хемолитотрофных микроорганизмов (Трухин и др., 2012).

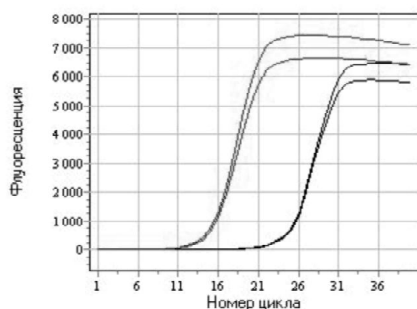
Разработанные тест-системы основаны на использовании интеркалирующего красителя SYBR Green I. Важным свойством интеркалирующих красителей является их способность к встраиванию в двуцепочечную молекулу ДНК. Флуоресцентный сигнал, получаемый в ходе реакции, является неискаженным отображением динамики накопления продукта реакции, что наилучшим образом подходит для количественного анализа нуклеиновых кислот. Единственным недостатком методов, основанных на использовании интеркалирующих красителей, является возможность регистрации накопления продуктов неспецифической амплификации. Для верификации результатов ПЦР в реальном времени нами была проведена оценка возможности кросс-реакции разработанных видоспецифичных олигонуклеотидов. Для этого каждую пару праймеров тестировали на всех имеющихся образцах чистых культур в серии из четырех экспериментов. На образцах чистых культур *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *S. thermosulfidooxidans* и *F. acidiphilum* протестированы пары праймеров *AtF*, *AtR* и *AfF*, *AfR* и пары праймеров *Fer-d*, *Fer-r1* и *Sulf-d1*, *Sulf-r*. Ни в одной из параллельных реакций неспецифическая амплификация не отмечена (см. рисунок).

Кроме того, нами была определена нуклеотидная последовательность продуктов ПЦР из пяти реакций для каждого эксперимента. Во всех случаях полученная последовательность совпадала с последовательностями целевых фрагментов гена 16S рРНК. Таким образом, разработанные тест-системы могут быть использованы при оценке состава смешанных сообществ биовыщелачивающих микроорганизмов, а также для качественной и количественной диагностики микроорганизмов *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *S. thermosulfidooxidans* и *F. acidiphilum*.

а

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср. Fam	Ср. Hex	Результат
G8	A.thiooxidans (2 bioleach)	15,3		+
H8	A.thiooxidans (2 bioleach)	15,3		+
D9	K- (2 bioleach)	25,1		+
E9	K- (2 bioleach)	25,1		+

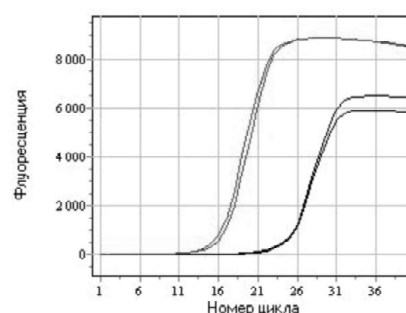
Зависимость флуоресценции канала FAM от номера цикла



б

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср. Fam	Ср. Hex	Результат
E8	A.ferrooxidans (2 bioleach)	16,8		+
F8	A.ferrooxidans (2 bioleach)	16,3		+
D9	K- (2 bioleach)	25,1		+
E9	K- (2 bioleach)	25,1		+

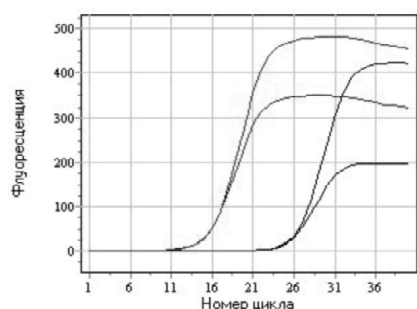
Зависимость флуоресценции канала FAM от номера цикла



в

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср. Fam	Ср. Hex	Результат
D2	S.thermosulfidooxidans	15,4		+
D3	S.thermosulfidooxidans	16,0		+
D10	K- (2 bioleach)	25,5		+
D11	K- (2 bioleach)	26,5		+

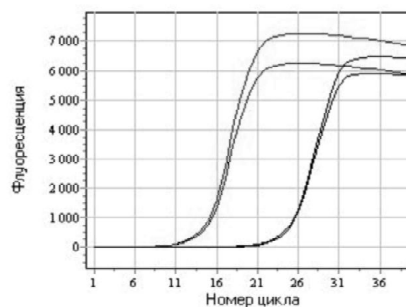
Зависимость флуоресценции канала FAM от номера цикла



г

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср. Fam	Ср. Hex	Результат
A9	F.acidiphilum (2 bioleach)	14,8		+
B9	F.acidiphilum (2 bioleach)	14,8		+
D9	K- (2 bioleach)	25,1		+
E9	K- (2 bioleach)	25,1		+

Зависимость флуоресценции канала FAM от номера цикла



Результаты ПЦР в реальном времени, полученные при амплификации ДНК, выделенной из чистых культур (а – *A. thiooxidans*, б – *A. ferrooxidans*, в – *S. thermosulfidooxidans*, г – *F. acidiphilum*) с использованием универсальных праймеров *upr2-d*, *upr3-r*

The real-time PCR results obtained by amplification of DNA isolated from pure cultures (а – *A. thiooxidans*, б – *A. ferrooxidans*, в – *S. thermosulfidooxidans*, г – *F. acidiphilum*) using universal primers *upr2-d*, *upr3-r*

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технология биогеометаллургии для извлечения металлов из руд в последнее время активно используется и развивается. Возрастает количество заводов, использующих биовыщелачивание. Исследователи нескольких стран изучают микробное разнообразие биовыщелачивающих растворов, используя в том числе и современные методы – анализ библиотеки клонов и полимеразную цепную реакцию в реальном времени. Настоящая работа дополняет и уточняет некоторые вопросы промышленного биовыщелачивания.

В ходе работы создана модель молекулярно-генетического исследования смешанных бактериальных сообществ и апробирована комплексная методика, позволяющая установить их видовой состав. Впервые в России апробирована методика, основанная на ПЦР в реальном времени,

позволяющая определить качественный и количественный состав сообществ хемолитотрофных микроорганизмов в модельных процессах биовыщелачивания. Данная методика позволяет проанализировать видовой состав автохтонных хемолитотрофных сообществ микроорганизмов, выделенных из сульфидных руд медно-никель-кобальтового месторождения «Шануч» (Камчатка).

В большинстве последних отечественных работ по интенсификации процесса биовыщелачивания не определяется качественный и количественный состав микробной ассоциации, вносимой в выщелачивающий раствор. В основном используют аборигенную микрофлору, находящуюся в исходной пульпе, подразумевая, что аборигенная микрофлора адаптируется к условиям выщелачивающего раствора.

В течение длительного времени считалось, что выщелачивание сульфидов протекает благодаря

только тионовым бактериям *A. ferrooxidans*. Использование в качестве источников энергии широкого круга окисляющих субстратов (сульфидов, элементарной серы и др.), устойчивость бактерий к ионам тяжелых металлов и низким значениям pH, а также широкий уровень изменчивости в экстремальных условиях среды обусловили ведущую роль *A. ferrooxidans* в бактериально-химических технологиях вскрытия золота или выщелачивания цветных металлов (Агеева и др., 2003; Каравайко, 1973). При этом методы интенсификации процесса выщелачивания были направлены на получение активных штаммов *A. ferrooxidans* и оптимизацию среды их жизнедеятельности. Однако в работе П. А. Заулочного (2011) сделан вывод о том, что исчерпаны ресурсы по интенсификации процесса бактериального окисления концентратов с использованием монокультуры *A. ferrooxidans*.

В настоящей работе показано, что основным представителем микроорганизмов медно-никелевого месторождения «Шануч» на Камчатке является *A. ferrooxidans*, а также различные его штаммы, в отличие, например, от представителей *Leptospirillum* sp. и *Sulfobacillus* sp., широко применяемых в биовыщелачивании на других месторождениях.

Однако возможно включение в скрининг биовыщелачивающих сообществ месторождения «Шануч» других бактерий, принимающих участие в выщелачивании и ранее обнаруженных на месторождении – *A. caldus*, *A. ferrivorans*, *L. ferrooxidans*, *L. thermoferrooxidans*, *L. ferriphillum*, *Alicyclobacillus disulfidooxidans*, *S. acidophilus*, *F. cupricumulans* (Кузякина и др., 2008). Возможно, пересмотр состава микробной ассоциации впоследствии будет иметь значение для получения другой ассоциации, обладающей более высокой окисляющей способностью.

В ходе работы разработан и внедрен в исследовательский процесс проект методических рекомендаций проведения качественного и количественного молекулярно-генетического исследования смешанных бактериальных сообществ, используемых в реакторах при биовыщелачивании. Методические рекомендации являются универсальными для сообществ микроорганизмов, выщелачивающих сульфидные руды, и могут быть применены для экспресс-анализа видового разнообразия хемолитотрофных микроорганизмов, в модельных экспериментах по определению эффективности выщелачивающих микробных сообществ и на производстве для быстрого и точного анализа взятых проб биомассы инокулята с руды из выщелачивающего раствора.

Таким образом, полученные с помощью молекулярно-генетических методов данные подтверждают и дополняют результаты микробиологических исследований, а также служат осно-

вой для создания сообществ микроорганизмов, обладающих максимальной окисляющей активностью, и разработки новых эффективных способов биовыщелачивания. Полученные данные о структуре сообществ являются новым знанием в области экологии микроорганизмов, а примененные в ходе анализа методы могут служить универсальным инструментом в практической биогеотехнологии.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта ДВО РАН «Определение видового и количественного состава бактериальных сообществ, участвующих в процессе биовыщелачивания сульфидных руд» № 13-III-B-06-093.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Агеева С. Н., Кондратьева Т. Ф., Каравайко Г. И. Плазмидные профили штаммов *Acidithiobacillus ferrooxidans*, адаптированных к разным субстратам окисления // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 5. – С. 651–657.
- Заулочный П. А. Интенсификация технологии бактериального выщелачивания упорных золотосульфидных концентратов с использованием ассоциации микроорганизмов, включая умеренно-термофильные бактерии : дис. ... канд. техн. наук. – М., 2011. – 168 с.
- Каравайко Г. И. Микроорганизмы рудных месторождений, их физиология и использование в гидрометаллургии : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 1973. – 51 с.
- Каравайко Г. И., Росси Дж., Агапе А. и др. Биогеотехнология металлов. Практическое руководство. – М. : Центр междунар. проектов ГКНТ, 1989. – 375 с.
- Кузякина Т. И., Хайнасова Т. С., Левенец О. О. Биотехнология извлечения металлов из сульфидных руд // Вестн. КРАУНЦ. Науки о Земле. – 2008. – Т. 12, № 2. – С. 76–86.
- Левенец О. О. Научно-техническое обоснование способов биовыщелачивания в мезофильных условиях сульфидной кобальт-медно-никелевой руды месторождения «Шануч» (Камчатка) : автореф. дис. ... канд. техн. наук. – Улан-Удэ, 2012. – 20 с.
- Ребриков Д. В., Саматов Г. А., Трофимов Д. Ю. и др. ПЦР в реальном времени. – М. : Бином, 2009. – 216 с.
- Рогатых С. В., Докиужкина А. А., Хайнасова Т. С. и др. Использование технологии ПЦР в реальном времени для оценки эффективности методов выделения ДНК из культур ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47, № 2. – С. 226–230.
- Трухин Ю. П., Хайнасова Т. С., Рогатых С. В. Выделение хемолитотрофных микроорганизмов из окисленной руды медно-никелевого месторождения «Шануч» (Камчатка) для биовыщелачивания сульфидных руд // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2012. – № 1 (2). – С. 83–87.
- Bowei C., Xingyu L., Wenyan L., Jiankang W. Application of clone library analysis and real-time PCR for comparison of microbial communities in a low-grade copper sulfide ore bioheap leachate // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – Vol. 36. – P. 1409–1416.
- Breed A. W., Dempers C. J. N., Hansford G. S. Studies on the bioleaching of refractory concentrates // J. South African IMM. – 2000. – Vol. 100, No. 7. – P. 161–174.

*Brierley J. A., Brierley C. L.* Present and future commercial applications of biohydrometallurgy // *Hydrometallurgy*. – 2001. – Vol. 59, No. 2–3. – P. 73–79.

*Ehrlich H. L.* Past, present and future of biohydrometallurgy // *Hydrometallurgy*. – 2001. – No. 59. – P. 127–134.

*Han C. J.* Physiological studies of extremely thermoacidophilic microorganisms under normal and stressed con-

ditions : Dissertation for the degree of doctor of philosophy. – North Carolina State University, 1998. – 220 p.

*Rawlings D. E.* Industrial practice and the biology of leaching of metals from ores // *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. – 1998. – Vol. 20. – P. 268–274.

*Sanger F., Coulson A. R.* A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase // *J. Mol. Biol.* – 1975. – Vol. 94, No. 3. – P. 441–448.

*Поступила в редакцию 06.03.2013 г.*

## APPLICATION OF MOLECULAR GENETIC APPROACHES TO ASSESSMENT OF CHEMOLITHOTROPHIC MICROBIAL COMMUNITIES AT THE SHANUCH DEPOSIT (KAMCHATKA)

*S. V. Rogatykh, I. A. Kofiadi, S. V. Muradov, A. A. Balykov*

For the first time the qualitative and quantitative composition of the chemolithotrophic acidophilic communities of microorganisms from the Shanuch deposit of sulfide ores was studied with the application of molecular genetic approaches. The efficiency of base methods of purification DNA of chemolithotrophic microorganisms was estimated by means of the developed model. The modified method for molecular analysis of the community structure of acidophilic chemolithotrophic microorganisms was recommended. This method is based on GuSCN leaching activity with further purification by phenol and chloroform. According to the analysis of the studied community clones library, the majority of nucleotide sequences was shown to be members of genus *Acidithiobacillus*. The sequences of alphaproteobacteria of the Acetobacteriaceae family, bacteria *Acidiphilium* sp., Archaea *Thermococcus* sp., and *Ferroplasma* sp. were found available, as well.

**Key words:** Shanuch deposit, polymerase chain reaction, chemolithotrophic microorganisms, library of nucleotide sequences.