

Рогатых Станислав Валентинович

канд. биол. наук, доцент

ФГБОУ ВО «Камчатский государственный

университет им. В. Беринга»

г. Петропавловск-Камчатский, Камчатский край

ОПТИМАЛЬНАЯ ТЕМПЕРАТУРА ОТЖИГА ПРАЙМЕРОВ ТЕСТ-СИСТЕМ ПРИ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ СУЛЬФИДНЫХ МЕСТОРОЖДЕНИЙ

***Аннотация:** в статье представлены экспериментальные данные по проведению градиентной полимеразной цепной реакции с целью выявления оптимальной температуры отжига праймеров. ПЦР-тест-система олигонуклеотидов, использованная в работе, реализуется при выполнении работ по созданию коллекции аборигенных ассоциаций хемолитотрофных микроорганизмов различных руд сульфидных медно-никелевых месторождений. Показано влияние температуры отжига праймеров на выделенную пробу ДНК основных представителей биовыщелачивающегося сообщества.*

***Ключевые слова:** месторождение Шануч, полимеразная цепная реакция, хемолитотрофные микроорганизмы, тест-системы олигонуклеотидов.*

Территория Российской Федерации, в том числе и Камчатский край, располагает минерально-сырьевой базой, способной развить в широких масштабах биометаллургию. Шанучское месторождение на западе Камчатке обладает богатыми сульфидными медно-никелевыми рудами для переработки [4]. Современное внедрение технологий биометаллургии невозможно без знания четких данных о структуре микробных сообществ или ассоциаций, вносимых в нарабатываемую культуру выщелачивающего раствора. Причем данные о качественном составе микробной культуры и количественном соотношении микроорганизмов в ней необходимо узнавать перед внесением ее в выщелачивающий раствор [1; 2; 5]. Это позволяет интенсифицировать процессы биовыщелачивания не только путем проведения модельных экспериментов с различными микробными

ассоциациями, но и оперативно контролировать и отслеживать процесс выщелачивания, вносить коррективы и управлять микробной популяцией при мониторинге процесса.

Нами разработан и внедрен в исследовательский процесс проект методических рекомендаций проведения качественного и количественного молекулярно-биологического исследования смешанных бактериальных сообществ, используемых в реакторах при биовыщелачивании, основанный на полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. В связи с этим, целью настоящего исследования являлось выявление оптимальной температуры отжига праймеров, входящих в состав ПЦР-тест-систем.

Выделение ДНК смешанных культур автохтонных хемолитотрофных микроорганизмов, полученных из окисленной и неокисленной руд кобальт-медно-никелевого месторождения Шануч (Камчатка), осуществляли по методике, описанной ранее [3]. В выделенном микробном сообществе предположительно находились *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* и *Ferroplasma acidiphillum*. Оптимальную температуру отжига определяли постановкой градиентной ПЦР с температурой отжига в диапазоне 60–72°C с последующей оценкой количества ПЦР-продукта методом агарозного гель-электрофореза. ПЦР проводили с помощью набора *GenPak®PCR Core* производства ООО «Лаборатория Изоген» (Москва) на амплификаторе Eppendorf AG22331 Naamburg (Германия) по следующей программе: 95°C – 30 с, T_м – 30 с, 72°C – 20 с в течение 40 циклов [3]. Электрофорез проводили в 1% агарозном геле 30 мин. при 200 мА, 65 Вт, 300 В.

Результаты приведены на рисунке 1. На нем видно, что оптимальной температурой отжига праймеров для *A. thiooxidans* (первые лунки в группах температур) не выявлено. Это скорее всего связано с тем, что в исследуемой пробе данный вид не представлен. Оптимальными температурами отжига праймеров для *A. ferrooxidans* (вторые лунки в группах) являются от 60,1 до 64,9°C. Оптимальной температурой отжига праймеров для *S. thermosulfidooxidans* (третьи лунки в группах) является весь спектр поставленных температур, за исключением 72,0°C.

Для *F. acidiphilum* оптимальной температурой отжига праймеров (четвертые лунки в группах температур) также не выявлено. Это также связано с тем, что в исследуемой пробе данный вид не представлен или амплификация прошла неудачно. Оптимальной температурой отжига для универсальных на общую биомассу микробного сообщества праймеров (пятые лунки в группах) является весь спектр поставленных температур. Обобщив данные, можно сделать вывод о том, что для используемых ПЦР-тест-систем оптимальной температурой отжига праймеров является температура в 64,9°C.

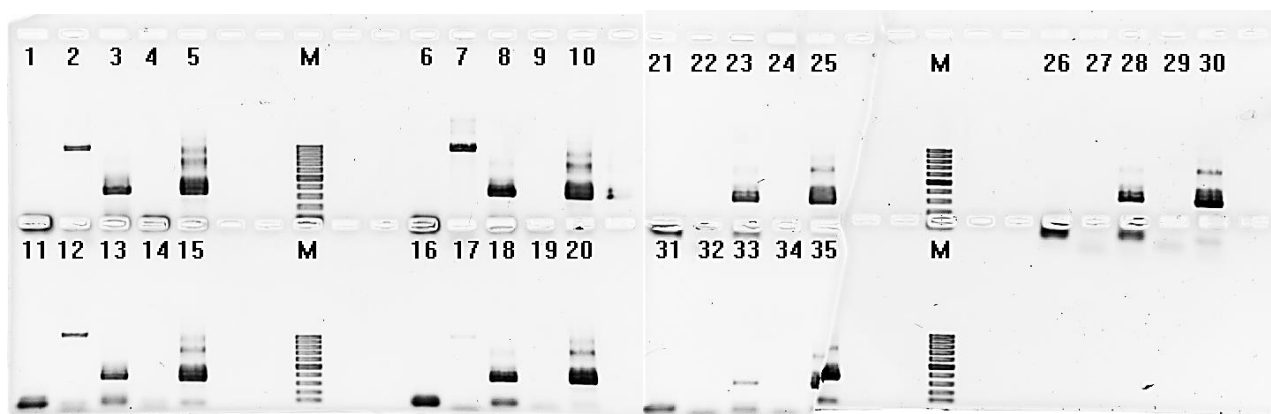


Рис. 1. Электрофореграммы ПЦР-продуктов, наработанных с использованием праймеров для *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *S. termosulfidooxidans*, *F. acidiphilum* и универсальных на общую биомассу микробного сообщества соответственно

Температура отжига праймеров: лунки 1–5 – 60,1°C, лунки 6–10 – 61,9°C, лунки 11–15 – 64,9°C, лунки 16–20 – 66,5°C, лунки 21–25 – 68,1°C, лунки 26–30 – 69,6°C, лунки 31–35 – 72,0°C, М – маркер молекулярного веса.

Список литературы

1. Вайнштейн М.Б. Состав бактериальных сообществ в отвалах сульфидных никелевых руд / М.Б. Вайнштейн, А.В. Вацурина, С.Л. Соколов, А.Е. Филонов [и др.] // Микробиология. – 2011. – Т. 80. – №4. – С. 560–567.
2. Каравайко Г.И. Литотрофные микроорганизмы окислительных циклов серы и железа / Г.И. Каравайко, Г.А. Дубинина, Т.Ф. Кондратьева // Микробиология. – 2006. – Т. 75. – №5. – С. 593–629.

3. Рогатых С.В. Использование технологии ПЦР в реальном времени для оценки эффективности методов выделения ДНК из культур ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов / С.В. Рогатых, А.А. Докшукина, Т.С. Хайнасова, С. В. Мурадов [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47. – №2. – С. 226–230.

4. Трухин Ю.П. Камчатская никеленосная провинция / Ю.П. Трухин, В.А. Степанов, М.Д. Сидоров // Доклады Академии наук. – 2008. – Т. 418. – №6. – С. 802–805.

5. Rawlings D.E. Characteristics and adaptability of iron- and sulfuroxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates // Microbial cell factories. – 2005. – Vol. 4. – №13. – P. 1–15.