

А.У. Исаева¹, Р. Панкиевич², А.А. Отарбекова^{1*}, Л.В. Рубцова¹

¹Южно-Казахстанский государственный университет им. М. Ауэзова,
Казахстан, г. Шымкент, e-mail: aina_756@mail.ru

²Университет им. Адама Мицкевича в Познани, Польша, г.Познань

МИКРОФЛОРА ФОСФОРСОДЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ ЮЖНОГО КАЗАХСТАНА

В статье приведены результаты микробиологических исследований фосфорсодержащих отходов. Было выделено 70 изолятов, из них к бактериям было отнесено 36 изолятов, что соответствует 51% от общего количество выделенных микроорганизмов, 7 изолятов отнесено к актиномицетам (10%) и 3 культуры к дрожжам (4%), 24 изолята относятся к микромицетам (35%). На основании скрининга микроорганизмов было отобрано 14 наиболее активных штаммов, перспективных для биоготехнологических целей. На основании результатов изучения культуральных признаков и данных ПЦР-анализа выделенные штаммы были отнесены к таким видам микромицетов как: *Aspergillus niger* AsIA, *Aspergillus tubingensis* AsPN, *Aspergillus terreus* JOM, *Aspergillus flavus* AsZ, *Aspergillus flavus* AsF, к денитрифицирующим бактериям – *Pseudomonas stutzeri* NJA, к термофильным бактериям – *Methyloversatilis thermotolerans* MSO, *Nitrosomonas europaea* Nit1, *Ralstonia pickettii* ASA и *Ralstonia pickettii* TS, *Acinetobacter* sp. NAO, *Alicyclobacillus tolerans* ST (*Sulfobacillus thermosulfidooxidans*), *Zoogloea resiniphila* NS1, *Gallionella capsiferiformans* TS2, к ацидофильным бактериям – штаммы *Acidithiobacillus ferrooxidans* ThIO, *Acidithiobacillus thiooxidans* ThIO.

Ключевые слова: фосфорсодержащие отходы, микрофлора, ПЦР, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Aspergillus niger*, *Nitrosomonas europaea*, *Gallionella capsiferiformans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.

A.U. Issayeva¹, R. Pankiewicz², A.A. Otarbekova¹, L.V. Rubtsova¹

¹M.Auezov South Kazakhstan State University, Kazakhstan, Shymkent, e-mail: aina_756@mail.ru

²Adam Mickiewicz University in Poznań, Poland, Poznan

Microflora of phosphorus-containing wastes of South Kazakhstan

The article presents the results of microbiological studies of phosphorus-containing wastes. 70 isolates were isolated, of which 36 isolates were assigned to bacteria, which corresponds to 51% of the total number of isolated microorganisms, 7 isolates were assigned to actinomycetes (10%) and 3 cultures to yeast (4%), 24 isolates were assigned to micromycetes (35%). Based on the screening of microorganisms, 14 of the most active strains that are promising for biogeotechnological purposes were selected. Based on the results of the study of cultural characteristics and PCR analysis data, the isolated strains were assigned to such types of micromycetes as: *Aspergillus niger* AsIA, *Aspergillus tubingensis* AsPN, *Aspergillus terreus* JOM, *Aspergillus flavus* AsZ, *Aspergillus flavus* AsF, to denitrifying bacteria *Pseudomonas stutzeri* NJA, to thermophilic bacteria *Methyloversatilis thermotolerans* MSO, *Nitrosomonas europaea* Nit1, *Ralstonia pickettii* ASA and *Ralstonia pickettii* TS, *Acinetobacter* sp. NAO, *Alicyclobacillus tolerans* ST (*Sulfobacillus thermosulfidooxidans*), *Zoogloea resiniphila* NS1, *Gallionella capsiferiformans* TS2, to acidophilic bacteria strains: *Acidithiobacillus ferrooxidans* ThIO, *Acidithiobacillus thiooxidans* ThIO.

Key words: phosphorus waste, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Aspergillus niger*, *Nitrosomonas europaea*, *Gallionella capsiferiformans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.

А.У. Исаева¹, Р. Панкиевич², А.А. Отарбекова^{1*}, Л.В. Рубцова¹

¹М. Ауэзов атындағы Оңтүстік Қазақстан мемлекеттік университеті,
Қазақстан, Шымкент қ., e-mail: aina_756@mail.ru

²Адам Мицкевич университеті, Польша, Познань қ.

Оңтүстік Қазақстанның құрамында фосфоры бар қалдықтарының микрофлорасы

Мақалада құрамында фосфоры бар қалдықтарға жасалған микробиологиялық зерттеулер нәтижелері келтірілді. Бөлініп алынған 70 изоляттың ішінде 36 изолят бактерияларға, бұл бөлініп алынған микроорганизмдердің жалпы санының 51% құрайды, 7 изолят актиномицеттерге (10%)

және 3-і ашытқыларға (4%), ал 24 изолят микромицеттерге (35%) жататындығы анықталды. Микроорганизмдердің культуралды-морфологиялық, таксономиялық белгілері зерттелді. Микроорганизмдер скринингісі негізінде ең белсенді 14 штамдар іріктелді. Хемолитотрофты, ацидофильді, термофильді және микромицетты микроорганизмдердің, мысалы: AsIA *Asp. niger*, AsPN *Aspergillus tubingensis* штаммы, JOM штаммының *Aspergillus terreus*, AsZ и AsF- к *Aspergillus flavus* штаммына, NJA денитрифицирлеуші *Pseudomonas stutzeri* бактерияларына, MSO *Methyloversatilis thermotolerans*, нитрифицирлеуші Nit1 штаммы *Nitrosomonas europaeae*, ASA и TS – *Ralstonia pickettii*-ге, NAO – *Acinetobacter sp.*, ST – *Alicyclobacillus tolerans* (*Sulfobacillus thermo-sulfidooxidans*), NS1 – *Zoogloea resiniphila*, TS2 – *Gallionella capsiferriformans*, ThIO- *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* штамдары қауымдастығының құрылымын бағалау үшін қажетті полимеразды тізбекті реакция негізінде тест-жүйелерін жасау кезіндегі алынған тәжірибелік мәліметтер келтірілген.

Түйін сөздер: құрамында фосфоры бар қалдықтар, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Aspergillus niger*, *Nitrosomonas europaeae*, *Gallionella capsiferriformans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.

Сокращения и обозначения

Acid.ferrooxidans-Acidithiobacillus ferrooxidans, *Asp. niger-Aspergillus niger*, РЗЭ-редкоземельные элементы, РЭМ-растрово-электронный микроскоп

Введение

В последние годы применение микроорганизмов в процессах извлечения металлов из техногенных отходов приобретает все большее расширение. Основание к этому служит экономический эффективность в биотехнологии, а также необходимость совершенствования процесса добычи природных богатств в сфере производства. В нашей эпохе все микроорганизмы, применяющих в процессах биоокисления и биовыщелачивания, выделяют из биоценозов конкретного ареала, специфичных для региона добычи. В ходе использования наиболее характерна модель применения комплексной ассоциацией микроорганизмов, а не единичный штамм. Одним из основных факторов, применения комплексных микроорганизмов является наиболее продуктивным и результативным в биотехнологических процессах выщелачивание. По данным работы Рогатых С. В. в биотехнологических процессах, таких как биовыщелачивание и биоокисление, применяют в общей сложности около 20 видов микроорганизмов, способных использовать неорганические вещества рудного материала [Rogatykh S.V. et al., 2013, Rogatykh S.V. 2018].

Технология биовыщелачивания, как комплексного процесса не представляется возможным без данных о ассоциации микроорганизмов входящий в состав выщелачивающего раствора. В ходе внесения микробной культуры в выщела-

чивающего раствора, необходимо иметь характерные и достоверные данные о видовом и количественном соотношений микроорганизмов.

Известен ряд исследований, посвященных поведению редкоземельных элементов в фосфоритовых рудах (Sadaqah et al., 2005, Borra et al., 2015) и природных водах (Kulaksız, Bau, 2011, Piper et al., 2013, Yang et al., 2013). Была исследована возможность получения композиции РЗЭ из месторождения Liyang Plain в Северном Китае (Zhou et al., 2011). А также, например, использование микроорганизмов (бактерий рр. *Thiobacillus*, *Leptospirillum*, термофильных архей) позволяет повысить эффективность добычи золота до 85–95% по сравнению с 15–30% при использовании обычных технологий [Rogatykh S.V. et al., 2013, Rogatykh S.V. 2018].

Из известных видов фосфатного сырья, перерабатываемых на удобрения наибольшую практическую ценность как источник РЗЭ представляет апатитовый концентрат, содержащий около 0,9% РЗЭ (Iqdari et al., 2003, Kidder et al., 2003). В фосфоритах содержание РЗЭ значительно ниже и обычно оно не превышает 0,1% и их извлечение сопряжено с определенными технологическими сложностями (Jin et al., 2007, Galfati et al., 2010).

Применение композиции ассоциацией микроорганизмов в процессе биологического выщелачивания, делает возможным извлекать РЗЭ из сырья, обладают способностью разрушат металлсодержащие минералы, окислять железо с двухвалентного до трехвалентного, переводить металлы из минералов в раствор.

В мезофильных условиях ведущую роль в окислительных процессах играют ацидофильные тионовые бактерии, которые используются в гидрометаллургии (Ibrahim et al., 2011, Wang et al., 2014, Jahani et al., 2015). Наиболее часто

для биовыщелачивания используются бактерии *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Mishra D. et al., 2008, Naragobinda et al., 2013, Kaibin et al., 2014). Диапазон используемых в биогидрометаллургии микроорганизмов включает применение *Chromobacterium violaceum* (Faramarzi M.A. et al., 2004), *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (Xia J.I. et al., 2010), *Sulfolobus metallicus* (Jordan H. et al., 2006), *Aspergillus niger* (Saanthiya D, Ting Y-P., 2006), *Leptospirillum ferrooxidans* (Lavalle L. et al., 2008). При использовании бактериальных и микромицетных культур для биовыщелачивания РЗЭ из фосфорсодержащих отходов была установлена прямая зависимость между объемом продуцируемой лимонной кислоты штаммом *Gluconobacter oxydans* FCC и степенью извлечения лантана (Reed D.W. et al., 2016). Известны исследования, связанные с разработкой технологии извлечения РЗЭ из фосфогипса *in situ* (Haschke et al., 2016). С другой стороны, при культивировании микроорганизмов для целей биовыщелачивания используются различные питательные среды, которые представляют собой определенные растворы солей с разными значениями pH и которые также могут влиять на поведение металлов.

На территории Южно-Казахстанской области складировано более 50,0 млн тонн фосфорсодержащих отходов, которые из-за процессов эрозий представляют серьезную угрозу для окружающей среды и здоровья населения. Вопросы рациональной утилизации данных отходов являются весьма важными для оздоровления экологической ситуации в регионе.

Цель исследования – является видовой анализ и идентификация микробно-бактериальных ассоциаций на основе полимеразной цепной реакции, участвующих в процессе биовыщелачивания фосфорсодержащих отходов.

Материалы и методы исследования

В качестве материала исследования были использованы фосфорсодержащие шлаки и шламы. Отбор проб фосфорсодержащих отходов проводили на отвале Шымкентского фосфорного завода. Кроме того, в исследованиях использовались штаммы железобактерий, микромицеты, нитрифицирующих бактерий, денитрифицирующих бактерий.

В ходе приготовления питательных сред для микроорганизмов были использованы ве-

сымарки Scout-Pro, а для стерилизации питательных сред автоклав SPGA-100-1-NN № 141.

Выделение микроорганизмов из проб фосфорсодержащих отходов проводили методом накопительных культур на питательных средах Сильвермана и Люндгрена 9К, среда Маннинга, для сероокисляющих бактерий среда Ваксмана, а также среда Виноградского I и II фазы для нитрифицирующих бактерий, среда агаризованная Чапека для микромицетов, мясо-пептонный агар (МПА) для гетеротрофных микроорганизмов. Для выделения скрининга мезофильных бактерий инкубацию культур производили при 37°C в течение 48-72 часов в термостате марки № ГС-1/80 СПУТУ 9452-002-00141798-97. В процессе культивирования проходила непрерывная аэрация. Чистые культуры аэробных микроорганизмов пересеивали методом истощающего штриха по Гоулду. Чистоту выделенных культур микроорганизмов оценивали общепринятыми методами: микроскопическим контролем по Грамму и высевом на питательную среду. Для определения бактериального титра, полученный после квартования образец, объемом 1г, размешивался в 100мл воды на встряхивателе в течении 30 минут. Полученную суспензию разводили в питательной среде методом 10-кратного разведения. 1мл суспензии образца культивировали на питательную среду.

Таксономический анализ микроорганизмов проводился с использованием [Don J. Brenner, Noel r. Krieg, James T. Staley and George M. Garrity, Bergey's manual of systematic bacteriology.2004].

При описаний макро и микро морфологических характеристик микромицетов определялись по колониям на чашках Петри учитывая форму, поперечный срез, края, текстуру, цвет, пигментная диффузия на агаре.

Идентификацию микроорганизмов проводили генотипированием по консервативному локусу 16S r DNA. Геномную ДНК выделяли из суточных культур бактерий с помощью набора для выделения ДНК PureLink Genomic DNA Kit согласно инструкции производителя (Invitrogen, Carlsbad, USA). Концентрацию ДНК и ПЦР-продукта в образцах определяли на флуориметре Qubit® 2.0 с помощью набора Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Oregon, USA).

Для амплификации участка 16s РНК готовили реакцию смесь в количестве 25 мкл: 12,5 µl Q5® HotStart High-Fidelity

2X Master Mix (New England BiolabsIns., USA); пара универсальных праймеров: 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 806R (5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3') [Vegas E.Z.S., et.al., 2006.] по 1,2 мкл в 10 μМ концентрации; ДНК матрица и вода до 25 μл. Режим амплификации состоял из следующих циклов: 95°C в течение 5 минут, затем: 95°C – 30 секунд, 55°C – 40 секунд, 72°C – 50 сек – 30 циклов; элонгация при 72°C в течение 10 минут.

ПЦР продукт разделяли в 1,2% агарозном геле, полосы окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ-транслюминаторе. В качестве электродного буфера использовали 1xTBE-буфер. ПЦР продукт очищали с помощью реагента для очистки Clean Sweep™ (Thermo Fisher Scientific, США).

Секвенирование фрагментов гена 16S rRNA бактерий проводили с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) согласно протокола производителя [BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol Applied Biosystems США]. Для очистки продуктов секвенирования использовали набор BigDye® X Terminator™ Purification Kit согласно протокола производителя. Капиллярный форез проводили на генетическом анализаторе ABI 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США).

Результаты секвенирования были выполнены с использованием программы SeqA (Applied Biosystems). Последовательность генов гомологичных нуклеотидных 16S рРНК была найдена в Международной базе данных банка генов Национального информационного центра по биотехнологии США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с использованием программы BLAST (Basic Search Equation Search Tool). Филогенетический анализ проводился с использованием программного обеспечения MEGA6. Выравнивание цепочки нуклеотидов осуществляли с использованием алгоритма ClustalW.

Молекулярно-генетическая идентификация образцов грибов проводилась с использованием 3-7 суточных штаммов грибов. Мицелий замораживали при -20° С, затем растирали пестиком в пробирке на 1,5 мл Eppendorf до порошкообразного состояния. Из полученной массы выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из растений/грибов «Plant/Fungi DNA Isolation Kit» компании Norgen Biotek Corp. (Ontario, Canada) согласно протокола произво-

дителя. Концентрацию ДНК в образцах определяли с помощью флуориметра Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Oregon, USA) по шкале для dsDNA HS. В работе использовались универсальные праймеры *ITS*-региона грибов: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') и (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Реакционная смесь для амплификации состояла из: 12,5 мкл Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, 1,25 мкл Forward праймер (10 мкМ), 1,25 мкл Reverse праймер (10 мкМ), 1,5 мкл ДНК и 8,5 воды. Общий объем ПЦР-смеси составлял 25 мкл.

ПЦР проводили на амплификаторе Eppendorf ProS (Hamburg, Germany) при режиме амплификации: 94°C – 30 сек; 55°C – 1 мин; 72°C – 40 сек – всего 30 циклов; 72°C – 10 мин. Результаты амплификации просматривали в 1,2% агарозном геле. ПЦР продукты очищали реагентом CleanSweep™ PCR Purification reagent (Applied Biosystems, USA).

С помощью BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) проводили реакцию секвенирования, согласно по инструкции производителя [BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol Applied Biosystems США], с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA). По результатом секвенирования обрабатывали в программе SeqA (Applied Biosystems, USA). Полученные нуклеотидные последовательности *ITS*-региона ДНК грибов были подвергнуты сравнению с данными базы GeneBank (www.ncbi.nih.gov), с помощью программы BLAST.

При видеомикроскопии материала использовали видеокарты растрово- электронного микроскопа JSM-6490LV с системами энергодисперсионного микроанализа INCA Energy фирмы OXFORD Instruments (Великобритания), с приставкой для исследования текстуры и структуры поликристаллических образцов HKL Basic .

Статистический анализ результатов. Эксперименты проводили пять раз в повторениях, рассчитывали стандартное отклонение при $0,95 > P > 0,80$. Статистическая обработка проводилась с использованием статистического программного пакета Microsoft Excel на ПК «Pentium-IV». По количеству измерений и в общей диагностической группе определяли среднее арифметическое (Schabenberger O and Pierce FJ., 2002).

Результаты исследования и их обсуждение

Во многих исследовательских работах по интенсификации процесса биовыщелачивания не рассматривается качественный и количественный состав микробных сообществ, участвующих в процессе биовыщелачивания. В основном используются естественный консорциум микроорганизмов, находящийся в исходном составе отходов. На протяжении многих лет биовыщелачивание металлов основывалось на применении тионовых бактерий *A. ferrooxidans*. В настоящее время в технологиях переработки техногенных отходов используют композиции микроорганизмов высокоактивных штаммов, которые являются перспективным направлением интенсификации процесса выщелачивания.

В результате лабораторных экспериментов всего было выделено 70 изолятов, из которых к бактериям было отнесено 36 изолятов, что соответствует 51% от общего количества выделенных микроорганизмов, 7 изолятов отнесено к актиномицетам (10%) и 3 культур к дрожжам (4%), 24 изолятов относятся к микромицетам (35%).

Культурально-морфологические характеристики отобранных штаммов представлены в таблице 1.

Видовую принадлежность активных изолятов определяли генотипированием по консервативному локусу *16s r RNA*.

При электронно-микроскопическом исследовании структуры мицелия штамма *Asp.nigerAsIA* были выявлены характерные конидиеносцы с конидиеспорами (рисунок 1 а,b), использование светового микроскопа позволило отметить участки гиф с плазмолизом цитоплазмы в отдельных септированных участках (рисунок 1с,d). При электронно-микроскопическом исследовании морфологии штамма *A.ferrooxidansThIO* показывает наличия палочек с закрытыми концами (рисунок 2 а,b).

Учитывая максимальный процент совпадения анализируемой последовательности в международной базе данных по алгоритму программы *BLAST*, а также результатов филогенетического анализа (рисунок 3 и 4) установлено, что степень гомологии с ближайшим штаммов: образцы *AsIA* относятся *Asp. niger*, штамм *AsPN* относится к *Aspergillus tubingensis*, штамм *JOM* относится к *Aspergillus terreus*, штаммы *AsZ* и *AsF* - к *Aspergillus flavus*, штамм *NJA* к денитрифицирующим бактериям *Pseudomonas stutzeri*, к термофильным бактериям относится штамм *MSO Methyloversatilis thermotolerans*, штамм *Nit1 Nitrosomonas europaeae*, штаммы *ASAI* и *TS* – *Ralstonia pickettii*, *NAO* – *Acinetobacter* sp., *ST* – *Alicyclobacillus tolerans* (*Sulfobacillus thermosulfidooxidans*), *NS1* – *Zoogloea resiniphila*, *TS2* – *Gallionella capsiferiformans*, штаммы *ThIO-Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Таблица 1 –Таксономическая характеристика культур микроорганизмов

Шифр изолятов	Таксономические признаки		Род, вид
	Макроморфология	Микроморфология	
<i>IOM</i>	Колонии кремовые, постепенно становятся темно-желтые, обратная сторона колонии темно-коричневые. Форма колоний круглая с фестончатым краем. Поверхность колоний выпуклая. Профиль приподнятый, консистенция колоний мягкая.	Гифы септированные, бесцветные. Конидиальная головка круглая. Конидиеносцы слегка шероховатые.	<i>Aspergillus terreus</i>
<i>AsIA</i>	колонии от чисто-белых до слегка желтоватых, от шерстистых до бархатистых. Скорость роста умеренная.	Гифы септированные, бесцветные. Конидиальные головки вначале шаровидные, радиальным расположением цепочек конидий.	<i>Asp. niger</i> ,

Шифр изолятов	Таксономические признаки		Род, вид
	Макроморфология	Микроморфология	
<i>AsPN</i>	Колонии на агаре Чапека при 25 °С на 7-е сутки 6,5–7 см в диаметре, с чёрным спороношением. Реверс бледный. Образует мелкие бело-жёлтые склероции 0,5–0,8 мм в диаметре.	Гифы септированные, конидии шаровидные 4-5 мкм в диаметре, с морщинисто-бородавчатой поверхностью. Апикальное вздутие конидиеносца 45–69 мкм в диаметре, головки двухъярусные.	<i>Asp. tubingensis</i>
<i>AsZ</i> <i>AsF</i>	Цвет колонии лимонно-зеленого цвета, от шерстистых до ватообразных. Экссудат светло-коричневый.	Гифы септированные, бесцветные. Конидиальная головка радиальная. Конидиеносцы грубошероховатые, бесцветные, 400-800 × 15-20 мкм. Вздутия от шаровидных до округлых, 20-45 мкм. Метелки покрывают почти полностью поверхность вздутия. Форма конидии шаровидная.	<i>Aspergillusflavus</i>
<i>AiOF 10</i>	Колонии бледно-зеленоватые. С обратной стороны темно-коричневые. Экссудат коричневый.	Гифы септированные, конидиеносцы короткие.	<i>Aspergillus spp</i>
ЮФМ 1 (2)	Колонии тускло-зеленые. С обратной стороны лиловые.	Гифы бесцветные, септированные. Конидиальная головка овальная.	<i>Aspergillus spp</i>
<i>AiA</i>	Цвет колонии от темно-оливково-зеленых до коричнево-зеленых. С обратной стороны темно-коричневого цвета.	Гифы септированные, бесцветные. Конидиальная головка в виде колонок. Конидиеносцы короткие (50-200 мкм), гладкие или слегка шероховатые, бесцветные. Вздутия полусферические (диаметром 8-20 мкм), с фиалидами без метул, только в верхней части. Конидиальные колонки часто извитые и закрученные. Конидии от цилиндрических или эллиптических до округлых, шероховатые, 4-7 × 3-5 мкм.	<i>Aspergillusrestrictus</i>
<i>AO 50F</i>	Колонии белые, постепенно бледно-желтовато-зеленые, с обратной стороны лимонного цвета.	Гифы септированные, конидиальная головка круглая, радиальная. Конидиеносцы короткие.	<i>Aspergillus spp</i>
<i>AiA F 50</i>	Колонии темно-синего цвета, мелкие, круглые. С обратной стороны колонии выделяют пигментацию синего цвета.	Под микроскопом видно слабые прозрачные гифы, не септированные, разветленные. Споры круглые, головка спорангиев круглые.	<i>Mucorales</i>
<i>AA (50)</i>	Колонии черного цвета, формы неровные, неправильной формы. С обратной стороны черные, пигментации нет. Колонии влажные.	Мицелиальные гифы похожи на псевдогифы.	<i>аскомицеты</i>

Шифр изолятов	Таксономические признаки		Род, вид
	Макроморфология	Микроморфология	
<i>FM</i>	Через 2-е суток дня в чашках Петри наблюдались воздушные мицелии. Колонии распространяются по пересмотренной чашке Петри, и на ранних стадиях светлый мицелий постепенно приобретает слабо розово-оранжевый цвет.	При микроскопировании были заметны почкующиеся споры. Гифы септированные, были заметны споры сферической формы.	<i>дрожжи</i>
<i>IOFB50</i>	Колонии молочно-желтого цвета, формы круглые, края ровные, поверхность выпуклая, профиль каплевидный, мягкой консистенции.	Грамотрицательные палочки, короткие, расположенные в виде цепочек, одиночно, парами	<i>Bacillus</i> sp.
<i>FIA50</i>	Колонии молочного цвета, форма колоний круглая фестончатым краем, с плоским профилем, гладкие, консистенция мягкая, размер колоний 0,5-1 мкм.	Грамотрицательные палочки, 0,4-0,5 мкм, расположены в виде скоплений, соединенные парами	<i>Bacillus</i> sp.
<i>FIAO50 Micrococcus</i>	Колонии оранжевые, красные, круглые, мелкие, профиль плоский, гладкие, с ровными краями, мягкой консистенции, с ровным и гладким краем, диаметром 1-4 мкм, с однородной структурой.	Клетки 24 часовой культуры кокковидные. Клетки неподвижные, грамположительные	<i>Micrococcus</i> sp.
<i>BIOM 1</i>	Круглые, плоские колонии, молочного цвета с выраженным центром, диаметром 2мм и меньше, с неровными краями	Грамположительные кокки, встречающихся в виде коротких цепочек, расположение различные.	<i>Micrococcus</i> sp
<i>NJA</i>	Колонии круглые, плоские, одинаковых размеров, слизистые, бежевого цвета.	Грамотрицательные, слегка изогнутые палочки, 0,5-1,0x 1,5-5,0 мкм. расположение различные.	<i>Pseudomonas</i> stutzeri
<i>ASAnTS</i>	Колонии прозрачные, бежевого цвета, круглые, с четкими ровными краями, выпуклые, с мягкой консистенцией.	Клетки подвижные, короткие палочковидные, размером 0,5–0,7x1,5–2,5 мкм, грамотрицательные	<i>Ralstoniapickettii</i>
<i>NAO</i>	Колонии имеют морщинистую форму с обильным образованием слизи и выделением пигмента.	Короткие и округлые палочковидные бактерии, расположены одиночно.	<i>Acinetobacter</i> sp.,
<i>ST</i>	Колонии одинаковых размеров, пастообразные, края неровные, мягкой консистенции	Грамположительные палочки 0,5- 0,9x 2,0-4,0 мкм, с закругленными концами, одиночные, в парах или короткие цепочки.	<i>Alicyclobacillus</i> tolerans
<i>NS1</i>	Прозрачно-бежевые колонии, слизистые, с ровными краями.	грамотрицательные, клетки палочковидные, расположение различные.	<i>Zoogloearesiniphila</i>
<i>TS2</i>	Колонии молочного цвета, форма колоний круглая, с плоским профилем, консистенция мягкая.	Клетки имеют бобовидную форму, мелкие.	<i>Gallionellacapsiferriformans</i>

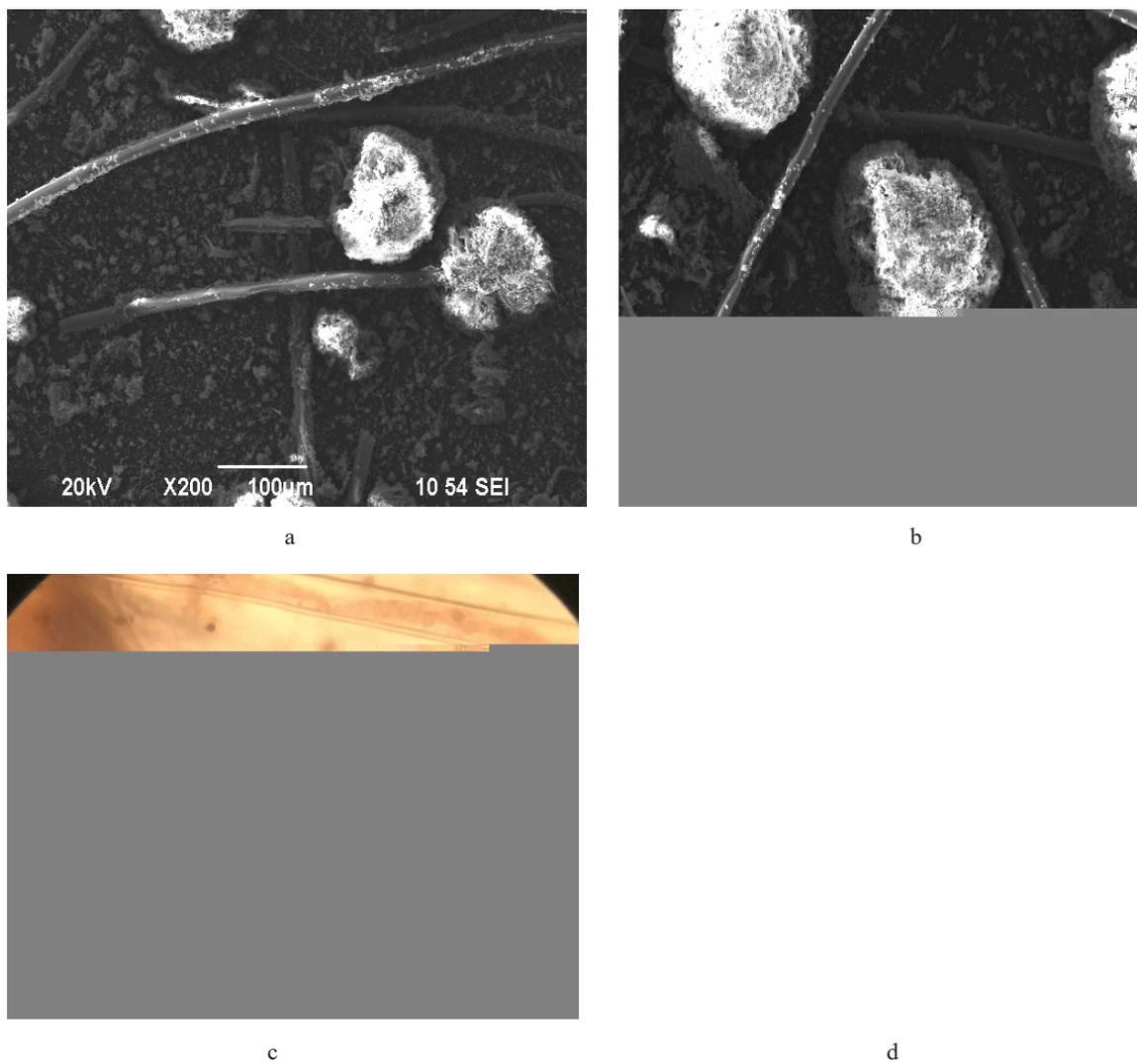


Рисунок 1 – Микроскопическое строение микромицета *Asp. nigerAsIA* а. РЭМ(х 200);б. РЭМ (х 250), микроскопическое строение *Asp. Niger AsIA* при световом микроскопе (а, б х 280)

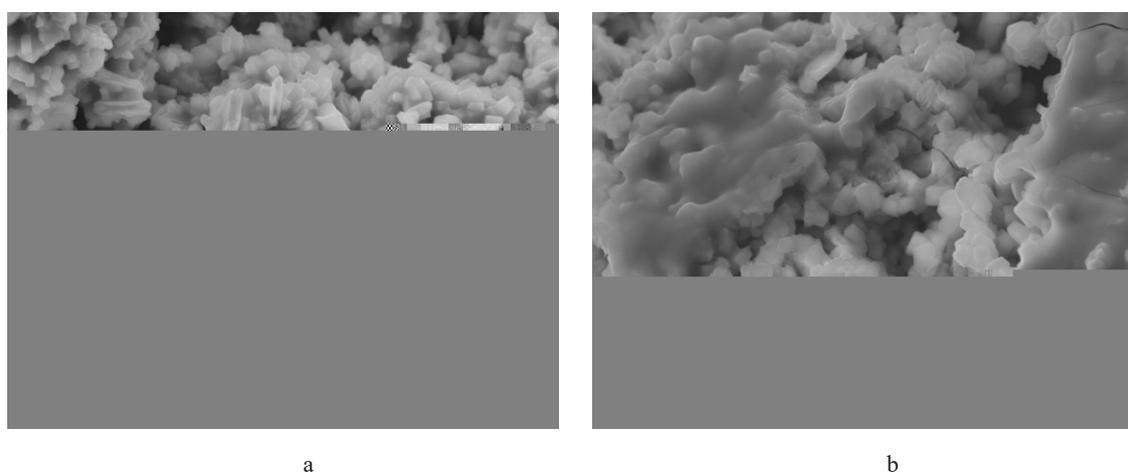


Рисунок 2 – Электронно-микроскопическое строение *Acidithiobacillus ferrooxidans* ThIO(а, х 200; бх 250)

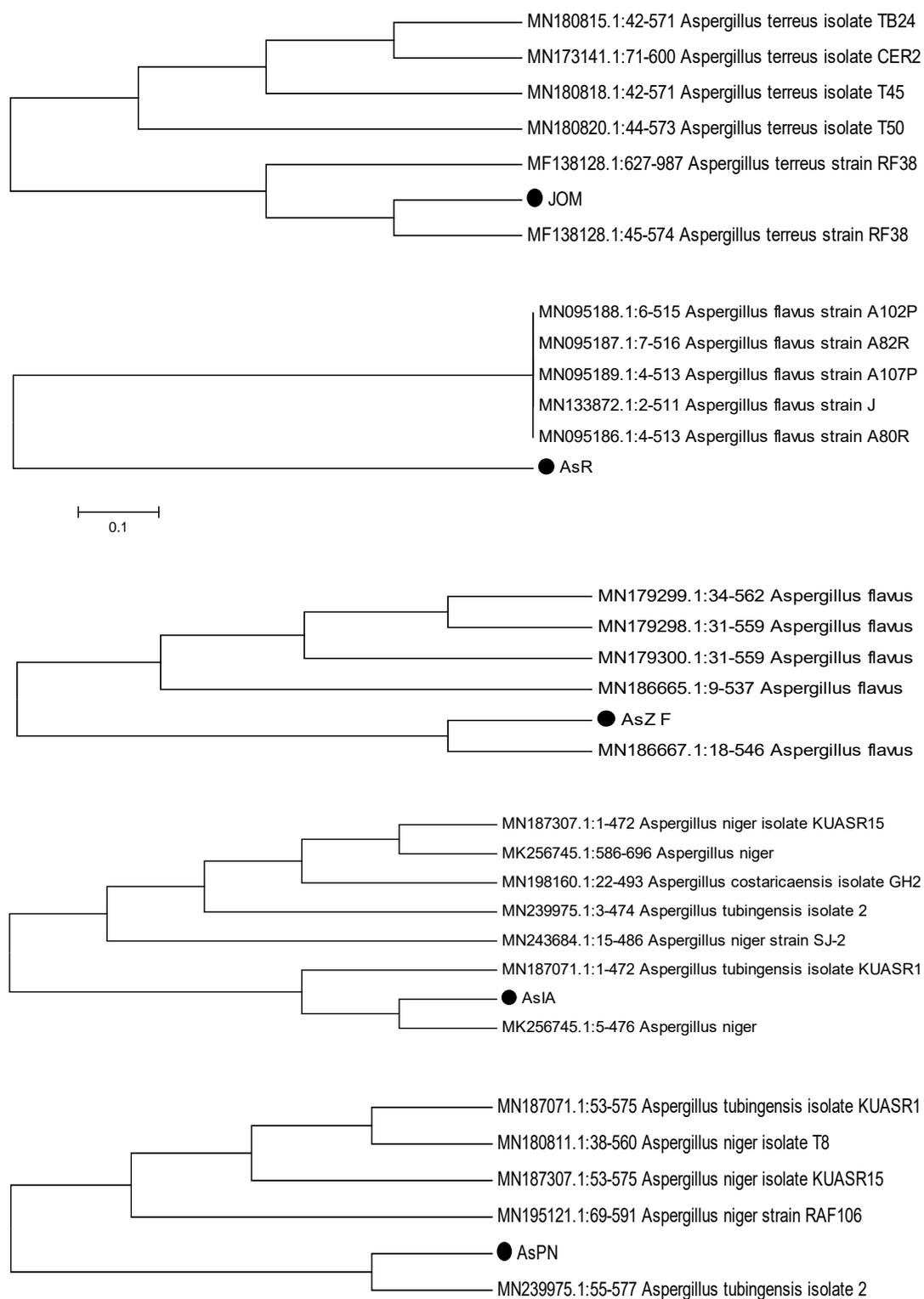


Рисунок 3 – Положение микромицетов, выделенных из фосфорсодержащих отходов в филогенетическом древе аспергилл

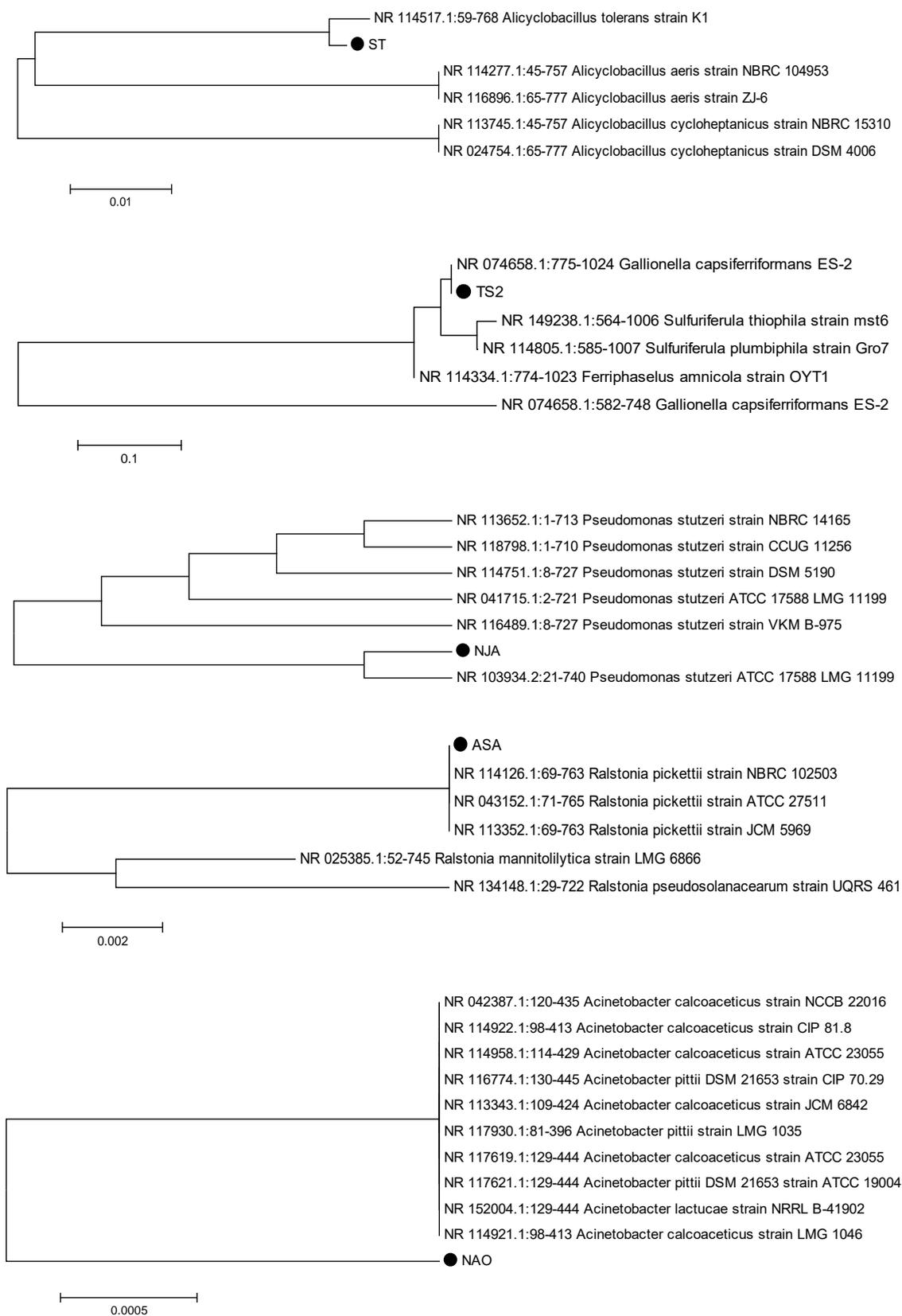


Рисунок 4 – Филогенетическое древо образцов бактерий, выделенных из фосфорсодержащих отходов

Полученный ПЦР продукт подвергали очистке с помощью набора ExS-Pure™ Enzymatic PCR Cleanup Kit (Nijmegen The Netherlands), согласно руководства к использованию. Затем измеряли концентрацию очищенного продукта (таблица 2).

Полученный продукт амплифицировали с помощью BigDyeTerminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) согласно протокола производителя.

После реакции секвенирования проводили вторую очистку ПЦР-продукта набором для очистки реакций секвенирования BigDyeXTerminator Purification Kit и загружали в генетический анализатор ABI 3500 для проведения капиллярного фореза, фореграмма образцов (рисунок 5) и последовательность нуклеотидов, полученная при секвенировании (рисунок 6).

Таблица 2 – Концентрация ПЦР-продукта после очистки

№ п/п	Наименование образца	Концентрация в нг/мкл
1	AsPN	46,6
2	AsIA	90,0
3	AsZ	19,0
4	AsF	18,84
5	JOM	12,9
6	AsN	16,9
7	ASA	10,8
8	NJA	18,5
9	TS	28,0
10	ST	33,4
11	NS1	16,5
12	NAO	52,0
13	TS2	12,5

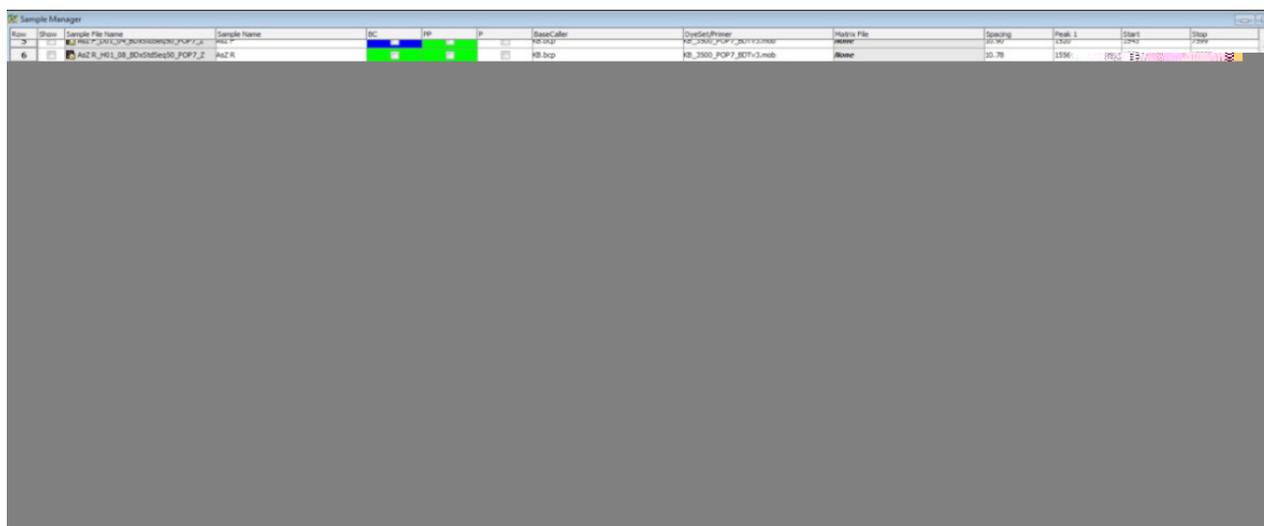


Рисунок 5 – Фореграмма образцов, полученная на приборе ABI 3500

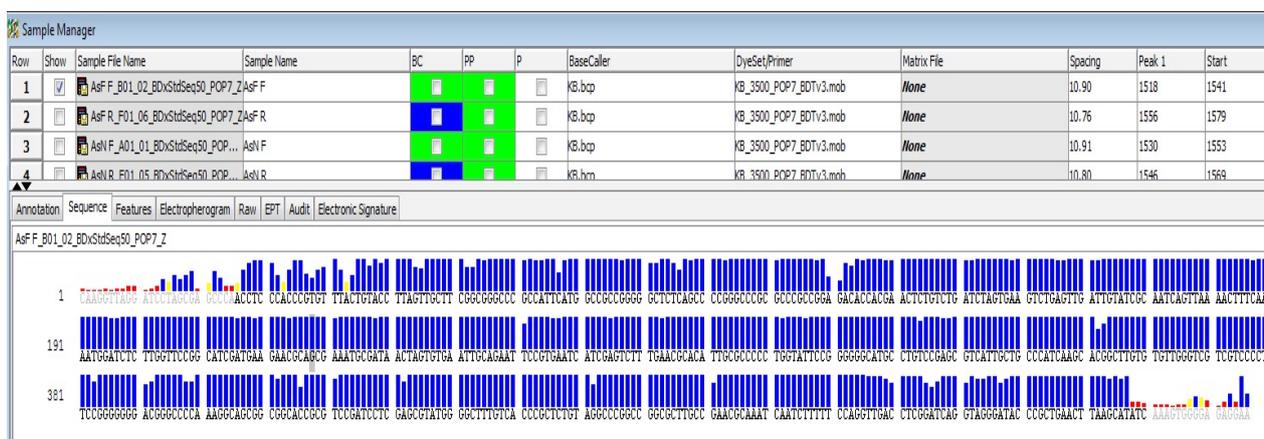


Рисунок 6 – Последовательность нуклеотидов, полученная при секвенировании

Заклучение

– В результате проведенных исследований из фосфорсодержащих отходов было выделено 70 изолятов, из которых к бактериям было отнесено 36 изолятов, что соответствует 51% от общего количество выделенных микроорганизмов, 7 изолятов отнесено к актиномицетам (10%) и 3 культур к дрожжам (4%), 24 изолятов относятся к микромицетам (35%). Изучены культурально-морфологические и свойства микроорганизмов. На основании скрининга микроорганизмов было

отобрано 14 наиболее активных штаммов.

– В результате проведения фенотипической и генетической идентификации выделенные микроорганизмы штаммы отнесены к различным таксономическим группам: *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Pseudomonas stutzeri*, *Methyloversatilis thermotolerans*, *Nitrosomonas europaea*, *Ralstonia pickettii*, *Acinetobacter* sp., *Alicyclobacillus tolerans* (*Sulfobacillus thermosulfidooxidans*), *Zoogloea resiniphila*, *Gallionella capsiferiformans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

References

1. Rogatykh S.V., Levenets O.O., Muradov S.V., Dokshukina A.A., Kofiadi I.A. Assessment of qualitative and quantitative composition of communities of cultivated acidophilic microorganisms by pcr-rv methods and analysis of clones library. *Microbiology*. 2013, Volume 82, No. 2, p. 212-217.
2. Rogatykh S.V. Primer systems used to identify representatives of the community of chemolithotrophic microorganisms of the Shanuch deposit (Kamchatka). July 4, 2018. DOI: 10.24411/1728-323X-2018-12060. № 2, 2018
3. Borra C. R., Pontikes Y., Gerven T.V. *Minerals Engineering*. Volume 76, Leaching of rare earths from bauxite residue (red mud). 15 May 2015, pp. 20-27.
4. Faramarzi MA, Stagars M, Pensini E, Krebs W, Brandl H. Metal solubilization from metal-containing solid materials by cyanogenic *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Biotechnology*. 2004; 113:321-326.
5. Galfati I., Sassi A. B., Zaier A., Bourhardon J. L., Bilal E., Joron J. L., Sassi S. *Geochemical Journal*. Geochemistry and mineralogy of Paleocene–Eocene Oum El Khecheb phosphorites (Gafsa–Metlaoui Basin) Tunisia., 2010, Vol. 44, pp. 189 – 210.
6. Haragobinda S, Ashish P, Dong JK, Seoung-Won L. *International Journal of Chemical, Nuclear, Metallurgical and Materials Engineering*. Comparison of Bioleaching of Metals from Spent Petroleum Catalyst Using *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. 2013, 7: 499-503.
7. Haschke M., Ahmadian J., Zeidler L., Hubrig T. *Procedia Engineering*. In-Situ Recovery of Critical Technology Elements. “SYMPHOS 2015”, 3rd International Symposium on Innovation and Technology in the Phosphate Industry. 2016, 138: 248 – 257.
8. Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James T. Staley and George M. Garrity. *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Springer. 2004.
9. Vegas E.Z.S., Nieves B., Araque M., Velasco E., Ruiz J., Vila J. Outbreak of infection with *Acinetobacter* strain RUH 1139 in an intensive care unit // *Infection Control and Hospital Epidemiology*. – 2006. – Vol. 27. – P. 397-404.
10. Ibrahim H. A., E. M. El-Sheikh. *Res. J. Chem. Sci.* Bioleaching Treatment of Abu Zeneima Uraniferous Gibbsite Ore Material for Recovering U, REEs, Al and Zn. 2011, vol. 2011, no. Vol. 1, pp. 55–66.
11. Iqdari, A., Velde, B., Benalioulhaj, N., Dujan, S. C. and Yamine, N. C.R. *Geoscience*. Exchange of light rare earth for Ca in apatite. 2003, 335, 381–390.
12. Jahani S., Fatemi F., Firoz-e-zare M. A., Zolfaghari M. R. *Electronic Journal of Biology*. Isolation and Characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* Strain FJS from Ramsar, Iran. 2015, Vol.11(4): 138-146.
13. Jin H, Wang H., Li J. *Chinese Journal of Rare Metals*. Investigation on Ore Characteristics of RE-Bearing Phosphorite Deposit in Xinhua Gezhongwu Ore Zone. 2007, 31(3).
14. Jordan H, Sanhueza A, Gautier V, Escobar B, Vergas T. Electrochemical study of the catalytic influence of *Sulfolobus metallicus* in the bioleaching of chalcopyrite at 70°C. *Hydrometallurgy*. 2006; 83: 55-62.
15. Kaibin F, Hai L, Deqiang L, Wufei J, Ping Z. *Environ Geochem Health*. Comparison of bioleaching of copper sulphides by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. 2014, 13: 664-672.
16. Kidder, D. L., Krishnaswamy, R. and Mapes, R. H. *Chem. Geol.* Elemental mobility in phosphatic shale during concretion growth and implications for provenance analysis. 2003, 198, 335–353.
17. Kulakstz, S., Bau, M. *Environ. Int.* Rare earth elements in the Rhine River, Germany: First case of anthropogenic lanthanum as a dissolved microcontaminant in the hydrosphere. 2011, 37, 973–979.
18. Lavallo L, Giaveno A, Pogliani C, Donati E. Bioleaching of a polymetallic sulphide mineral by native strains of *Leptospirillum ferrooxidans* from Patagonia Argentina. *Process Biochemistry*. 2008; 43:445-450.
19. Mishra D, Kim DJ, Ralph DE, Ahn JG, Rhee YH. Bioleaching of metals from spent lithium ion secondary batteries using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Waste Management*. 2008; 28: 333-338.
20. Piper D. Z., Bau M. *American Journal of Analytical Chemistry*. Normalized Rare Earth Elements in Water, Sediments, and Wine: Identifying Sources and Environmental Redox Conditions. 2013, 4, 69-83 <http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2013.410A1009>.
21. Reed, David W., Fujita, Yoshiko, Daubaras, Dayna L., Jiao, Yongqin, and Thompson, Vicki S. Bioleaching of rare earth elements from waste phosphors and cracking catalysts. *United States: N. p.*, 2016. Web. doi:10.1016/j.hydromet.2016.08.006.

22. Saanthiya D, Ting Y-P. Use of adapted *Aspergillus niger* in the bioleaching of spent refinery processing catalyst. *Journal of Biotechnology*. 2006; 121:62-74.
23. Sadaqah R. M., Abed A.M., Grimm K. A., Pufahl P. K. Dirasat, Pure Sciences. The Geochemistry of Rare Earth Elements (REE), Yttrium (Y) and Scandium (Sc) in Some Upper Cretaceous Jordanian Phosphorites. 2005, Volume 32, No. 1, p.32-47.
24. Schabenberger O, Pierce FJ. Contemporary statistical models for the plant and soil Sciences. CRC Press, BocaRaton, 2002, 442 p.
25. Wang J, Zhu S, Zhang Y, et al. *Journal of Central South University*. Bioleaching of low-grade copper sulfide ores by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. 2014, 21: 728-734.
26. Xia JI, Yang Y, He H, Liang CL, Zhao XJ, Zheng L, Ma CY, Nie ZY, Qiu GZ. Investigation of the sulfur speciation during chalcopyrite leaching by moderate thermophile *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. *International Journal of Mineral Processing*. 2010; 94: 52-57.
27. Yang, F., Kubota, F., Baba, Y., Kamiya, N., Goto, M. *Journal of Hazardous Materials*. Selective extraction and recovery of rare earth metals from phosphor powders in waste fluorescent lamps using an ionic liquid system. 2013, 254, 79-88.
28. Zhou K., Yang J., Guo W. *Environmental Earth Science*. The Rare Earth Element Composition of Sediments from the Loess Tableland in the Liyang Plain, Southern China: Implications for Provenance and Weathering Intensity. 2011, Vol. 62, No. 8, pp. 1609-1617. <http://dx.doi.org/10.1007/s12665-010-0644-x> .