

**ПОЛІМОРФІЗМ ШТАМІВ *ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS*,
ІЗОЛЬОВАНИХ ІЗ ВІДХОДІВ ВУГІЛЬНОЇ ТА ЕНЕРГЕТИЧНОЇ
ПРОМИСЛОВОСТІ УКРАЇНИ**

**Н. Васильєва, Т. Бродяженко, Т. Васильєва, Н. Лиманська,
І. Марінова, І. Блайда**

*Одеський національний університет імені І.І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса 65082, Україна
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua*

У статті наведено результати досліджень зі встановлення варіабельності штамів *Acidithiobacillus ferrooxidans*, які були вперше ізолювані з техногенних відходів підприємств вугільної та енергетичної промисловості України. Ці штами, згідно з результатами попередніх досліджень, повністю відповідають біологічним властивостям бактерій *A. ferrooxidans*, що наведені у визначнику Bergey's Manual of Determinative Bacteriology та інших оригінальних роботах [8, 10, 12, 18], також досліджені штами, незалежно від місця існування, мали стійкість до температури і рН, мали змішаний тип харчування, джерела енергії, які використовували штами, тощо [1, 10, 11]. Приналежність ізолюваних із різних за походженням відвалів ацидофільних хемоліотрофних штамів до *A. ferrooxidans* було досліджено з використанням методу ПЛР. Генетичний поліморфізм штамів було вивчено методом RAPD-ПЛР з використанням універсального праймеру M13. Показано, що ізолювані в ході дослідження з різних техногенних субстратів штами *A. ferrooxidans* характеризуються генетичною різноманітністю. Порівняння отриманих RAPD-профілів показало варіабельність штамів, яка збігається з їхніми основними фенотипічними властивостями, описаними раніше [11]. Найбільш неоднорідні профілі були характерні для *A. ferrooxidans* DTV 1, *A. ferrooxidans* Lad 5 і *A. ferrooxidans* Lad 27. Отримані профілі RAPD послужили основою для генерації дендрограми, яку побудовано з використанням методу Neighbor-Joining і розрахунку матриці подібності, заснованої на коефіцієнті подібності Нея та Лі. На підставі отриманої дендрограми показано формування двох кластерів, які об'єднують подібні між собою штами. Отримані показники вірогідності формування вузлів побудованої дендрограми коливаються від 65,0 до 76,0 %, що підтверджує високий ступінь подібності між штамами, згрупованими по кластерах. Також показано, що до першого з кластерів входять штами, ізолювані з вугілля та відходів його збагачення, а до другого кластеру – штами, ізолювані з відходів спалювання вугілля. Отримані дані підтверджують, що генетична варіабельність штамів залежить від первинного місця виділення штамів, а коефіцієнти подібності між ними (коефіцієнти подібності Нея та Лі) варіюють від 0,182 до 0,80.

Ключові слова: Acidithiobacillus ferrooxidans, ПЛР, RAPD-ПЛР, генетичний поліморфізм

Описані в літературі штами *A. ferrooxidans* демонструють значний фенотипічний розкид за такими ознаками як відношення до рН і температури, здатність до автотрофного і міксотрофного росту, діапазон стійкості до токсичних іонів металів і здатності до окислення сульфідів металів. Практично всі відомі штами *A. ferrooxidans* відрізняються також високим генетичним поліморфізмом – ступінь мінливості сягає 98,0 % [4, 18, 20, 22, 26–28]. Основними місцями існування *A. ferrooxidans* є поліметалеві природні середовища – сульфідні руди, кислі шахтні води, вулканічні відкладення, надзвичайно різнома-

нітні в географічному аспекті, що сприяє високому ступеню поліморфізму штамів роду *Acidithiobacillus*. В умовах різних екологічних ніш і за адаптації до конкретних субстратів штами цього виду характеризуються різними швидкостями росту, стійкістю до іонів важких металів і активністю окислення двовалентного заліза та/або природного сульфідного мінерального субстрату, а також техногенних відходів, таких як відходи збагачення і спалювання вугілля [1–3, 10, 17, 20]. Відомо, що штами *A. ferrooxidans* є найважливішими учасниками процесів бактеріального вилуговування металів із природних сульфідних руд за рахунок здатності використовувати як джерела енергії велике коло субстратів окиснення за досить широких діапазонів фізико-хімічних параметрів середовища. Наявні в літературі дані свідчать про значне різноманіття штамів *A. ferrooxidans*, як за фенотиповими, так і за генетичними ознаками. Вони різняться за розміром геному, змістом GC пар у ДНК, ступенем ДНК-ДНК гомології тотальних геномів, мають досить різноманітні плазмідні профілі, оптимальні для росту значення рН і температури, різний рівень стійкості до іонів важких металів і токсичних елементів, активність до окислення різних субстратів тощо.

Зараз штами *A. ferrooxidans* і *A. thiooxidans* широко використовують для біологічного вилуговування металів, десульфурзації вугілля і природного газу, дезактивації промислових відходів тощо [10, 11].

Оскільки саме штами *A. ferrooxidans* відіграють найважливішу роль у біотехнологічних процесах, їхнє вивчення на молекулярному рівні має велике значення для кращого розуміння філогенезу між видами, а також для розуміння залежності між геномною та фенотипічною мінливістю штамів *Acidithiobacillus* у процесі визначення мікроеволюційних механізмів утворення нових, важливих для біотехнологічних процесів видів.

Вважається, що схожість між штамми, які порівнюють і які ізолювані з різних географічних зон і місць існування, обумовлена подібними умовами мікрооточення, що сприяє селекційному тиску на штами. Це відображається як генетичний і фенотипічний поліморфізм і впливає на філогенетичні відносини штамів *A. ferrooxidans*, що, безсумнівно, має важливе значення. Так, Г.І. Каравайко, зі співавторами в одну генетичну групу об'єднали штами *A. ferrooxidans*, ізолювані з пірит-халькопіритових руд і мідних рудників, розташованих у різних географічних районах. Високу генетичну спорідненість цих штамів автори пов'язують з однаковими селективними умовами місць існування [4, 5, 15, 16].

На сьогоднішній день для ідентифікації та дослідження мінливості штамів різних мікроорганізмів широко використовують молекулярні технології на підставі ПЛП і RAPD-ПЛП. При RAPD-ПЛП використовують короткі довільні праймери, які гібридизуються з ДНК-мішенню за низької температури відпалу та за використання консенсусного праймера M13 [6, 14, 23]. Хоча RAPD піддавали критиці за недостатню відтворюваність і чутливість умов реакції, цей метод використовували у дослідженні геномного різноманіття серед штамів *A. ferrooxidans*, що дало змогу провести як міжвидову, так і внутрішньовидову дискримінацію штамів [7, 13, 19, 26–28].

На даний час інформація про поширення, різноманітність і властивості штамів *A. ferrooxidans* у відвальних продуктах паливно-енергетичного комплексу України досить обмежена. Вивчення їхніх основних біологічних і молекулярно-генетичних властивостей, їхньої подібності до типового штаму *A. ferrooxidans* ATCC 23270 має важливе теоретичне і практичне значення [1, 11].

Мета роботи полягала в тому, щоб із використанням методики, заснованої на ПЛП і RAPD ПЛП, вивчити геномну мінливість серед штамів *A. ferrooxidans*, ізолюваних з відходів вугільної та енергетичної промисловості України.

Матеріали та методи

Експериментальна частина роботи виконана у Біотехнологічному науково-навчальному центрі Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

Бактеріальні штами й умови їхнього вирощування. У роботі використовували штами *A. ferrooxidans*, ізолювані безпосередньо з вугілля та відходів після збагачення або спалювання вугілля (табл. 1). Усі дослідження проводили у порівнянні з типовим штамом *A. ferrooxidans* ATCC 23270 [25].

Таблиця 1

Штами *A. ferrooxidans*, ізолювані з відвальних продуктів ПЕК України [1, 11]

| № | Штам | Джерело виділення |
|---|---|--|
| 1 | <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270 | Типовий штам (буре вугілля зі шахт США) |
| 2 | <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lv red 9 | Червоний відвал, ЦЗФ «Червоноградська», Львівська обл.* |
| 3 | <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lv black 37 | Чорний відвал, ЦЗФ «Червоноградська», Львівська обл.** |
| 4 | <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> DTV 1 | Золошлак Добротвірської ТЕС, «ДТЕК Західенерго», Львівська обл. |
| 5 | <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lad 5 | Зола виносу Ладижинської ТЕС, «ДТЕК Західенерго», Вінницька обл. |
| 6 | <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lad 27 | Зола виносу Ладижинської ТЕС, «ДТЕК Західенерго», Вінницька обл. |
| 7 | <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Coal 17 | Вугілля шахти «Червоноградська», Львівська обл. |

Примітки: * – термін збереження 36–60 місяців; ** термін збереження 12–24 місяці

Культивування досліджених ацидофільних хемолітотрофних штамів здійснювали за загальноприйнятими методиками на середовищі Сільвермана-Лундгрема 9К [8, 11].

Виділення ДНК і проведення ПЛР і RAPD ПЛР. Безпосередньо перед проведенням аналізів ПЛР і RAPD ПЛР штами вирощували на рідкому середовищі 9К без заліза за температури $30,0 \pm 2,0$ °C на гойдалці за 120 об/хв протягом трьох днів.

Виділення й очищення ДНК досліджуваних штамів *A. ferrooxidans* проводили з використанням набору F1021 (SureFast® PREP Bacteria, Congen Biotechnologie GmbH, Germany), згідно з інструкцією виробника [9].

Під час проведення RAPD-ПЛР використовували універсальний праймер M13 [11, 21]. Ампліфікацію здійснювали згідно з такими параметрами: 35 циклів, що складаються з денатурації за 94 °C – 1 хв, відпалу праймерів за 45 °C – 1 хв і елонгації за 72 °C – 2 хв. Перед ампліфікацією суміш прогрівали за 94 °C протягом 3 хв, а після 35 циклів наставав етап елонгації за 72 °C протягом 5 хв.

Продукти ампліфікації розділяли в 1,5 % агарозному гелі. ДНК фарбували бромистим етидієм.

Як стандарти молекулярної маси ДНК використовували маркери Lambda DNA/EcoRI plus HindIII Marker (ThermoFisher Scientific Inc) і маркери 100 bp + 50 bp (SibEnzyme).

Статистичний аналіз. Коефіцієнти подібності Nei & Li [7] використовували для розрахунку спорідненості досліджуваних штамів між собою. Коефіцієнт подібності Nei & Li був розрахований за статистичним рівнянням:

$$F = 2 * N_{xy} / (N_x + N_y),$$

де F – коефіцієнт подібності, N_x і N_y – кількість фрагментів зі штаму, відповідно, тоді як N_{xy} – кількість фрагментів, спільних для двох штамів.

Отримані дані були проаналізовані шляхом порівняння профілів ПЛР RAPD згідно з наявністю або відсутністю (1 або 0 відповідно) кожної смуги ДНК, що відтворюється.

Матрицю подібності було згенеровано з використанням коефіцієнта подібності Нея та Лі, а дендрограму побудовано з використанням методу Neighbor-Joining (NJ method) [24].

Результати і їхнє обговорення

На підставі результатів досліджень, опублікованих раніше, ізольовані з відходів вугільної та енергетичної промисловості України і вивчені мезофільні штами залізоокиснювальних штамів ацидофільних хемолітотрофних бактерій віднесено до нових представників виду *A. ferrooxidans* [1, 10, 11].

Спільними властивостями для усіх штамів, незалежно від місця існування, були стійкість до температури і рН, змішаний тип харчування, джерела енергії, які використовували штами, тощо [1, 10, 11].

Після проведення ПЛР-RAPD з використанням праймеру M13 було отримано від 1 до 6 ампліконів ДНК досліджуваних штамів (рис. 1). Отримані продукти ампліфікації вказують на високий рівень генетичного поліморфізму. Серед вивчених профілів виявлено як ідентичні, так і досить неоднорідні профілі (рис. 1).

Як видно з наведеної електрофореграми, подібні профілі реєстрували для штамів *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. ferrooxidans* Lv black 37, *A. ferrooxidans* Coal 17 і *A. ferrooxidans* Lv red 9; неоднорідні профілі були характерні для *A. ferrooxidans* DTV 1, *A. ferrooxidans* Lad 5 і *A. ferrooxidans* Lad 27 (рис. 1).

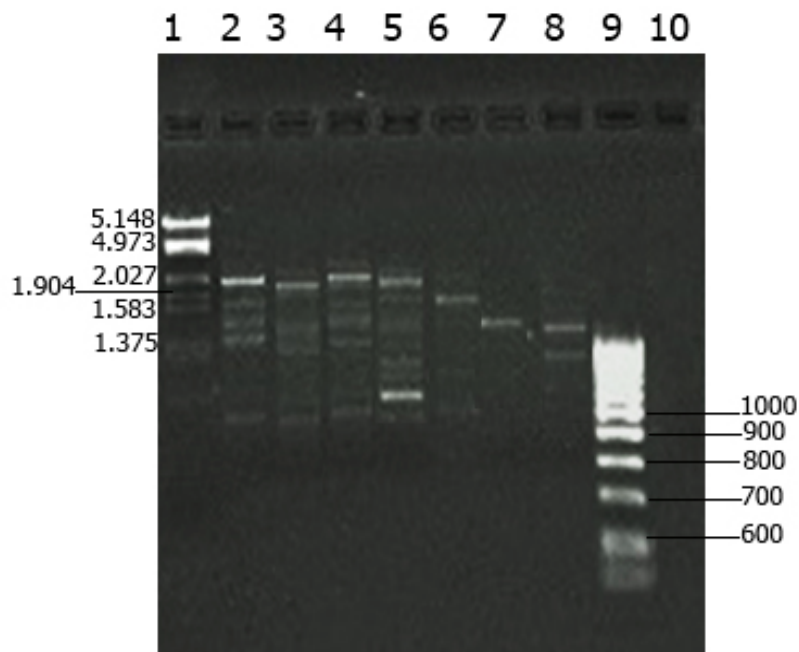


Рис. 1. Електрофореграма агарозного гелю з продуктами RAPD, які отримали шляхом ампліфікації ДНК штамів *A. ferrooxidans* з використанням праймера M13. Доріжки: 1 – маркери молекулярної маси Lambda DNA / EcoRI plus HindIII Marker; 2 – амплікон ДНК штаму *A. ferrooxidans* ATCC 23270; 3 – амплікон ДНК штаму *A. ferrooxidans* Lv black 37; 4 – амплікон ДНК штаму *A. ferrooxidans* Coal 17; 5 – амплікон ДНК штаму *A. ferrooxidans* Lv red 9; 6 – амплікон ДНК штаму *A. ferrooxidans* DTV 1; 7 – амплікон ДНК штаму *A. ferrooxidans* Lad 5; 8 – амплікон ДНК штаму *A. ferrooxidans* Lad 27; 9 – маркери молекулярної маси 100 bp + 50 bp (SibEnzyme, Росія); 10 – негативний контроль

Надалі кожен амплікон розглядали як окрему одиницю виміру, і дані були перетворені на матрицю, створену на підставі розмірів отриманих фрагментів під час проведення ПЛР RAPD. Згідно з результатами RAPD-аналізу, штами, ізольовані з вугілля та відходів його збагачення, незалежно від терміну зберігання, мають досить високу подібність між собою (рис. 1).

Отримані на її основі коефіцієнти подібності було застосовано для генерації дендрограми, побудованої з використанням методу NJ у програмі MEGA10 (рис. 2). До розрахунку подібності між штамми було включено модель Кімури. Для оцінки достовірності формування вузлів дендрограми виконали бутстреп із кількістю ітерацій 1000 (рис. 2).

Отриману дендрограму можна поділити на два кластери, перший із яких містить у собі штами *A. ferrooxidans* Lv black 37, *A. ferrooxidans* Lv red 9, *A. ferrooxidans* Coal 17 і типовий штам *A. ferrooxidans* 23270.

Ступінь схожості між штамми, які віднесені до даного кластеру, підтверджений показником імовірності формування вузла, отриманого під час проведення бутстреп аналізу. Як видно з рис. 3, показники вірогідності формування вузлів у першому кластері коливаються від 65,0 до 71,0 %. Це підтверджує високий ступінь подібності між штамми, залученими до даної філогенетичної групи на підставі матриці подібності, отриманої за результатами ПЛР RAPD.

Штами, виділені з відходів спалювання вугілля *A. ferrooxidans* Lad 27, *A. ferrooxidans* Lad 5 (зола виносу Ладижинської ТЕС) і *A. ferrooxidans* DTV 1 (зола шлак Добротвірської ТЕС), створюють другий кластер. Для всіх вузлів дендрограми також показано високий ступінь подібності – від 65,0 до 76,0 % (рис. 2).

Навіть незважаючи на подібність між профілями штамів, що належать до одного кластеру, ми не спостерігали повної ідентичності – ми відзначали відсутність профілів у вивчених штамів, які збігаються повністю, а це вказує на високу генетичну варіабельність досліджених штамів.

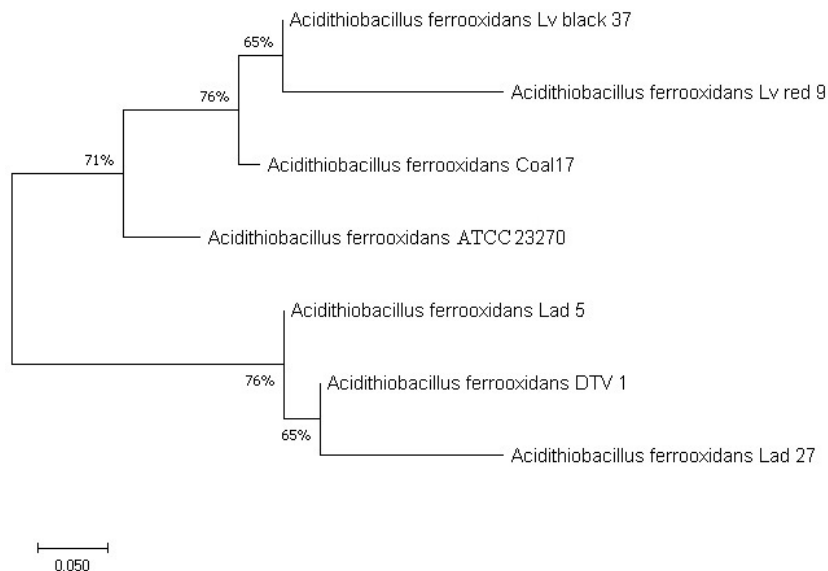


Рис. 2. Дендрограма генетичних відмінностей досліджених штамів *A. ferrooxidans*, побудована з використанням методу NJ та моделі Кімури на підставі даних RAPD-аналізу (у вузлах індекси бутстрепа, %)

Як додатковий метод перевірки генетичної схожості між дослідженими штамми *A. ferrooxidans* ми використовували матрицю подібності, засновану на коефіцієнті Ней і Лі (табл. 2).

Таблиця 2

Парні коефіцієнти генетичної подібності, розраховані за методом Nei & Li для різних штамів *A. ferrooxidans*

| Штам | <i>A. ferrooxidans</i> 23270 | <i>A. ferrooxidans</i> Lv black 37 | <i>A. ferrooxidans</i> Lv red 9 | <i>A. ferrooxidans</i> DTV 1 | <i>A. ferrooxidans</i> Lad 5 | <i>A. ferrooxidans</i> Lad 27 |
|------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| <i>A. ferrooxidans</i> 23270 | 1,00 | | | | | |
| <i>A. ferrooxidans</i> Lv black 37 | 0,545 | 1,00 | | | | |
| <i>A. ferrooxidans</i> Lv red 9 | 0,333 | 0,545 | 1,00 | | | |
| <i>A. ferrooxidans</i> DTV 1 | 0,286 | 0,333 | 0,286 | 1,00 | | |
| <i>A. ferrooxidans</i> Lad 5 | 0,250 | 0,286 | 0,250 | 0,500 | 1,00 | |
| <i>A. ferrooxidans</i> Lad 27 | 0,374 | 0,250 | 0,220 | 0,500 | 0,800 | 1,00 |
| <i>A. ferrooxidans</i> Coal 17 | 0,500 | 0,182 | 0,500 | 0,457 | 0,444 | 0,344 |

У даному разі цілком ідентичними вважаються об'єкти з цифровим виразом генетичних дистанцій, рівним 1, а відмінними – об'єкти зі значенням, рівним нулю. Обчислені коефіцієнти генетичної подібності варіювали від 0,80 для штамів *A. ferrooxidans* Lad 27 і *A. ferrooxidans* Lad 5 (табл. 2), що належать до другого кластеру дендрограми, яку було згенеровано за даними RAPD-аналізу (рис. 1). Так само для штамів, що належать до другого кластеру (*A. ferrooxidans* Lad 5, *A. ferrooxidans* Lad 5 і *A. ferrooxidans* DTV 1), було показано ступінь генетичної подібності на рівні 0,50 (табл. 2).

Типовий штам *A. ferrooxidans* 23270 має схожість на рівні 0,545 і 0,50 зі штамми *A. ferrooxidans* Lv black 37 і *A. ferrooxidans* Coal 17. Високий ступінь генетичної подібності (0,545) було показано між штамми *A. ferrooxidans* Lv red 9 і *A. ferrooxidans* Lv black 37 (табл. 2). Між штамми *A. ferrooxidans* Coal 17 і *A. ferrooxidans* Lv red 9 ступінь генетичної подібності становив 0,50 (табл. 2).

Отримані дані свідчать про наявність внутрішньовидового генетичного поліморфізму між різними штамми *A. ferrooxidans*, яка залежить від місця їхнього виділення.

Отримані дані можуть свідчити про те, що подібний генотип найчастіше переважає в субстратах одного типу, в якому наявні подібні чинники або умови, які можуть діяти як свого роду тиск добору для даної групи мікроорганізмів.

Внутрішньовидова генетична різноманітність, що спостерігається на основі RAPD ПЛР, відповідала нашим очікуванням. Як показано в дослідженнях [13, 16, 18], мікроеволюція штамів ацидофільних хемолітотрофних бактерій у кожній екологічній ніші супроводжувалася змінами в нуклеотидній послідовності їхньої хромосомної ДНК. Однак точний біологічний механізм, що лежить в основі цього розмаїття штамів, на даний час не є цілком зрозумілим.

Таким чином, у статті наведено результати оцінки генетичного поліморфізму нових штамів *A. ferrooxidans*, які були вперше ізольовані з кам'яного вугілля та продуктів його переробки – збагачення і спалення. За допомогою ПЛР і RAPD-ПЛР встановлено генетичні відмінності штамів і показано її залежність від умов існування штамів та місця ізоляції. Мабуть, ця залежність формується під селективним тиском (впливом) абіогенних і біоген-

них чинників довкілля. Проведені дослідження сприятимуть розумінню формування філогенетичних зв'язків між штамми *A. ferrooxidans* у специфічних техногенних субстратах і допоможуть передбачити їхній біотехнологічний потенціал залежно від первинного місця існування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Блайда И. А., Васильева Т. В., Ивануца В. А. Биотехнология извлечения редких металлов из отходов энергетики и угольной промышленности. Одесса: ОНУ, 2018. 171 с.
2. Иванов М. В., Каравайко Г. И. Геологическая микробиология // Микробиология. 2004. Т. 73. № 5. С. 581–597.
3. Каравайко Г. И., Дубинина Г. А., Кондратьева Т. Ф. Литотрофные микроорганизмы окислительных циклов серы и железа // Микробиология. 2006. Т. 75. № 5. С. 593–629.
4. Канаева З. К., Булаев А. Г., Канаев А. Т., Кондратьева Т. Ф. Физиологические свойства штаммов *Acidithiobacillus ferrooxidans*, выделенных из месторождений сульфидных руд республики Казахстан // Микробиология. 2015. Т. 84. № 3. С. 323–330.
5. Тушикина О. В., Саморукова В. Д., Кондратьева Т. Ф. Особенности роста и окисления природных пиритов представителями ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов // Микробиология. 2009. Т. 8. № 2. С. 202–212.
6. Albesharat R., Ehrmann M. A., Korakli M. et al. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies // Syst. Appl. Microbiol. 2011. Vol. 34. N 2. P. 148–155.
7. Akbar T., Akhtar K., Ghauri M. A. et al. Relationship among acidophilic bacteria from diverse environments as determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) // World J. Microb. Biot. 2005. Vol. 21. N 5. P. 645–648.
8. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. East Lansing, MI: Springer US, 2005. 1203 p.
9. Blanca E., Bustos K., Morales G., Salazar O. Rapid and specific detection of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* by PCR // Hydrometallurgy. 2008. Vol. 92. N 3–4. P. 102–106.
10. Blayda I. A., Vasyleva T. V., Baranov V. I. et al. Properties of chemolithotrophic bacteria new strains isolated from industrial substrates // Biotechnol. Acta. 2015. Vol. 8. N 6. P. 56–62.
11. Blayda I., Vasylieva T., Sliusarenko L. et al. Isolation and study of the main properties of acidophilic chemolithotrophic bacteria that have been isolated from the waste dumps by fuel-energy complex of Ukraine // Biol. Stud. 2018. Vol. 12. N 3–4. P. 3–16.
12. Bonnefoy V., Holmes D. S. Genomic insights into microbial iron oxidantion and iron uptake strategies in extremely acidic environments // Environ. Microbiol. 2012. Vol. 14. N 7. P. 1597–1611.
13. Chen Hong, Yang Bo, Chen Xin-Hua. Identification and characterization of four strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* isolated from different sites in China // Microbiol. Res. 2009. Vol. 164. N 6. P. 613–623.
14. Huey B., Hall J. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. // J. Bacteriol. 1989. Vol. 171. N 5. P. 2528–2532.
15. Kanaeva Z. K., Bulaev A. G., Kanaev A. T., Kondrat'eva T. F. Physiological properties of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains isolated from sulfide ore deposits in Kazakhstan // Microbiol. 2015. Vol. 84. N 3. P. 370–376.
16. Karavaiko G. I., Turova T. P., Kondrateva T. F. et al. Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans* // J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. Vol. 53. P. 113–119.

17. Kuzmishyna S., Hnatysh S., Moroz O. et al. Microbiota of Chervonograd Mining Region // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2014. Вип. 67. С. 234–242.
18. Liu Qian, Zhou Hong-bo, Yang Bo, Chen Xin-hua. Phenotypic and genetic characterization of a novel strain of *Acidithiobacillus ferrooxidans* (AF2) // J. Cent. South Univ. T. 2011. Vol. 18. N 2. P. 386–391.
19. Mohapatra D. R., Gould W. D., Dinardo O., Koren D. W. Tracking the prokaryotic diversity in acid mine drainage-contaminated environments: A review of molecular methods // Minerals Engineering. 2011. Vol. 24. N 8. P. 709–718.
20. Ni Yong-Qing, He Kai-Yu, Bao Jing-Ting, Yang Yuan. Genomic and phenotypic heterogeneity of *Acidithiobacillus* spp. strains isolated from diverse habitats in China// FEMS Microbiol Ecol. 2008. Vol. 64. P. 248–259.
21. Prillinger H., Molnar O., Eliskases-Lechner F., Lopandic K. Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese// Antonie van Leeuwenhoek. 1999. N 75. P. 267–283
22. Rawlings D. E. The molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans* and other mesophilic, acidophilic, chemolithotrophic, iron- or sulfur-oxidizing bacteria // Hydrometallurgy. 2001. Vol. 59. P. 187–201.
23. Reginensi S. M., Gonzalez M. J., Olivera J. A. et al. RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk // Int. J. Food Microbiol. 2011. Vol. 148. N 1. P. 36–41.
24. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // Mol. Biol. Evol. 2013. Vol. 30. P. 2725–2729.
25. Valdüs J., Pedroso I., Quatrini R., Dodson R. J. et al. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications // BMC Genomics. 2008. Vol. 9. P. 579–597.
26. Venturi M., Guerrini S., Granchi L., Vincenzini M. Typing of *Lactobacillus sanfranciscensis* isolates from traditional sourdoughs by combining conventional and multiplex RAPD–PCR profile // Int. J. Food Microbiol. 2012. Vol. 156. N 2. P. 122–126.
27. Waltenbury D. R., Leduc L. G., Ferroni G. D. The use of RAPD genomic fingerprinting to study relatedness in strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* // J. Microbiological. 2005. Vol. 65. N 1. P. 103–112.
28. Wu Xue-ling, Liu Li-li, Zhang Zhen-zhen, Deng Fan-fan. Molecular characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains isolated from different environments by three PCR-based methods // J. Cent. South Univ. 2015. Vol. 22. P. 455–465.

Стаття надійшла до редакції 27.08.19

доопрацьована 14.02.20

прийнята до друку 26.02.20

**DEFINITION OF GENETIC POLYMORPHISM OF STRAINS
ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS THAT WERE ISOLATED
FROM WASTE OF COAL AND ENERGY INDUSTRY OF UKRAINE**

**N. Vasylieva, T. Brodiazhenko, T. Vasylieva, N. Limanska,
I. Marinova, I. Blayda**

*National I.I. Mechnikov University
2, Dvorianska St., Odessa 65082, Ukraine
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua*

The results of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains genetic variability studies that were first isolated from waste by coal and energy industries of Ukraine are reported in this article. These strains, according to the results of previous studies, are fully consistent with the biological properties of *A. ferrooxidans* bacteria given in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology and other original works [8, 10, 12, 18] also strains studied, regardless of habitat, were resistant to temperature and pH, had a mixed type of food, similar energy sources used by strains, etc. [1, 10, 11]. Using PCR was confirmed the affiliation of isolated from different of origin dumps of acidophilic chemolithotrophic strains with *A. ferrooxidans*. Genetic polymorphism of the strains was studied by RAPD-PCR using universal primer M13. It was shown that strains of *A. ferrooxidans* that were isolated from various dumps have a wide genetic diversity. By PCR, their affiliation with the species *A. ferrooxidans* was confirmed. Comparison analysis of the obtained RAPD profiles showed the variability of the strains which coincides with their main phenotypic properties, as described earlier [11]. The most heterogeneous profiles were characteristic of *A. ferrooxidans* DTV 1, *A. ferrooxidans* Lad 5 and *A. ferrooxidans* Lad 27. The obtained RAPD profiles served as the basis for the generation of the dendrogram constructed using the Neighbor-Joining method and calculating the similarity matrix, based on the coefficient of similarity of Nei & Li. Based on the obtained dendrogram, the formation of two clusters that combine similar strains is shown. The obtained indicators of the probability of formation of nodes of the constructed dendrogram range from 65.0 to 76.0 %, which confirms the high degree of similarity between strains grouped by clusters. It is also shown that the first of the cluster includes strains that were isolated from coal and waste from its enrichment, and the second cluster includes strains that were isolated from coal waste. The obtained data confirm that the genetic variability of the strains depends on the primary location of isolation of the strains, and the coefficients of similarity between them varies from 0.182 to 0.80.

Keywords: Acidithiobacillus ferrooxidans, PCR, RAPD-PCR, genetic polymorphism