

УДК 579.[26+222.4]

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА,
АКТИВНОГО В БИОТРАНСФОРМАЦИИ МИНЕРАЛОВ ЖЕЛЕЗА
В КАОЛИНЕ

© 1996 г. Е. С. Турова, Г. А. Осипов

Институт микробиологии РАН, Москва

Поступила в редакцию 10.11.95 г.

Для экспрессного определения структуры активного в трансформации минералов железа в каолине микробного сообщества применен метод хромато-масс-спектрометрии. На основании перечня членов сообщества, выявленных с применением традиционных физиолого-биохимических методов, сформирован банк данных состава липидных компонентов клеток микроорганизмов сообщества. Исходя из состава жирных кислот, оксикислот и альдегидов суммарной биомассы сообщества, определенных ГХ–МС, перечень членов сообщества уточнен и определено их количество. В основу расчета положен принцип соответствия химического маркера и профиля. Составлена и оптимизирована система уравнений баланса, в которых концентрация каждого анализируемого вещества биомассы приравнена сумме вкладов членов сообщества, имеющих данное вещество в составе клетки. Разработанный алгоритм расчета позволит в дальнейшем проводить экспрессное определение структуры подобных сообществ по данным жирно-кислотного состава биомассы без выделения чистых культур.

Процесс биотрансформации минералов железа в каолине практически не изучен. Но известно, что в таких природных процессах, как образование нежелательно высоких концентраций растворимого железа в грунтовых водах, глееобразование, намагничивание (magnetization) водных осадков, ведущая роль принадлежит микробному восстановлению Fe(III) до Fe(II) [1]. Показана роль различных групп микроорганизмов в растворении, восстановлении Fe(III) и образовании железоорганических комплексов [2]. Это бактерии – представители родов *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Serratia*, *Proteus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Vibrio*, *Paracoccus*, *Bacteroides*, *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Achromobacter*, *Staphylococcus*, *Spirillum* и микроскопические грибы – представители родов *Actinomyces*, *Alternaria* и *Fusarium*. Изолированы штаммы, способные к диссимиляторному восстановлению железа: факультативно-анаэробный организм *Shewanella putrefaciens* [3] и строгий анаэроб *Geobacter metallireducens*, штамм GS-15 [4]. Хотя показано, что при росте на аморфном гидроксиде железа в лабораторных условиях *Sh. putrefaciens* и *G. metallireducens* могут образовывать магнетит (Fe₃O₄) [5], нет данных о том, что они активно вовлечены в этот процесс в природе.

Круг работ, посвященных изучению структуры железовосстанавливающих сообществ, ограничен. Колеман с соавт. [6], анализируя методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ–МС) липидные биомаркеры микробного сообщества морских осадков, показали, что совре-

менное образование конкреций сидерита (FeCO₃) в этих осадках является результатом активности сульфатвосстанавливающих бактерий.

Наличие специфических веществ (маркеров) в клеточных компонентах и микробных метаболитах микроорганизмов открывает возможность для направленного поиска и идентификации микроорганизмов в сообществах с использованием высокочувствительных методов – масс-фрагментографии или газовой хроматографии с детектором электронного захвата. Известно, что при изменении состава среды, условий культивирования и возраста культур определенным образом меняются и жирно-кислотные профили микроорганизмов. Тем не менее показано, что, если питательная среда и условия роста стандартизованы, жирно-кислотные профили для индивидуальных штаммов воспроизводимы и могут быть использованы для хемотаксономических целей [7]. Существует практика описания структуры сообществ микроорганизмов с использованием жирно-кислотного профиля [8, 9].

Осипов с соавт. [10] для экспресс-анализа состава накопительной культуры сульфатвосстанавливающих бактерий из заводняемого нефтяного пласта Талинского нефтяного месторождения впервые применили расчетный метод, позволивший определить состав микроорганизмов не только качественно, но и количественно. Результаты расчета подтверждены с помощью традиционных микробиологических методов.

В результате предварительных исследований нами было получено сообщество микроорганизмов, активное в биотрансформации минералов железа в глинах, использующихся в качестве керамического сырья [11]. Валовое содержание железа в каолинах составляет 0.6–0.8%. При этом часть железа находится в кристаллической решетке алюмосиликатов и оказывает малое влияние на цветность и белизну фарфоровых изделий. Ощутимо снижает их качество то железо, которое входит в состав оксидов – гетита $\alpha\text{-FeOOH}$ и гематита $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$. В результате развития сообщества происходит трансформация трудноудаляемых примесей каолинов – гетита и гематита в соединения, подвергающиеся магнитной сепарации.

Целью настоящей работы является анализ структуры указанного микробного сообщества исходя из данных жирно-кислотного состава суммарной биомассы, получаемого с помощью ГХ–МС.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Исследуемое сообщество микроорганизмов поддерживается пересевом на стерильную суспензию каолина Просяновского месторождения с добавлением питательной среды. Эксперимент проводили следующим образом: к водной суспензии каолина (Т : Ж = 3 : 1) добавляли 20 об. % среды следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2, KH_2PO_4 – 1, глюкоза – 5. Затем вносили инокулят (10 об. %). Инкубацию проводили при 30°C. При этом происходило расслоение суспензии на осадок и верхний слой – жидкую фазу. Для изучения структуры сообщества отбирали пробу осадка после двухнедельной инкубации. В качестве контроля использовали исходную водную суспензию каолина.

Состав сред и методы учета микроорганизмов. Для выявления отдельных физиологических групп микроорганизмов сообщество анализировали путем посева на жидкие и плотные питательные среды методом предельных разведений. Численность аэробных гетеротрофных микроорганизмов определяли посевом на разведенный (1 : 10) МПБ, анаэробных бродильных микроорганизмов – в столбик среды Виноградского [12], сульфатовосстанавливающих бактерий – на среду Постгейта [13] с лактатом натрия (4 г/л), железовосстанавливающих микроорганизмов – на среду Лави с аморфным гидроксидом железа [14].

Аналитические методы. Формиат, ацетат, пропионат и бутират определяли газохроматографически, лактат – с помощью лактатдегидрогеназы, глюкозу – с помощью глюкозооксидазы и феррицианида калия [15], сероводород – методом Трюпера с диметил-*n*-фенилендиаминном [16], содержание растворенного в жидкости железа –

на атомно-абсорбционном спектрофотометре Perkin-Elmer 3100.

Аппаратура. Исследования жирно-кислотного состава проводили на хромато-масс-спектрометре HP-5985B фирмы "Hewlett-Packard" (США). Масс-спектрометр квадрупольный с диапазоном масс 2–1000 аеи имеет разрешающую способность 0.5 аеи во всем рабочем диапазоне. Ионизация электронами 70 эВ. Чувствительность прибора составляет 1 нг по метилстеарату в режиме непрерывного сканирования и 10 пкг в режиме селективных ионов. Для хроматографического разделения пробы использовали капиллярную колонку из плавленного кварца длиной 25 м и внутренним диаметром 0.2 мм. Неподвижная фаза Ultra-1 "Hewlett-Packard" с толщиной слоя 0.32 мкм. Хроматографирование проводили в режиме программирования температуры от 50 до 320°C со скоростью 5 град/мин. Температура инжектора и интерфейса 250°C.

Экстракцию липидов из пробы каолина осуществляли по методу Фолча смесью хлороформ-метанол-вода [17]. К навеске осадка (3 г) приливали 5 мл смеси и выдерживали 1.5 ч при комнатной температуре, дважды иницируя экстракцию на вибраторе "Vortex". После экстракции смесь центрифугировали при 3000 об/мин. Супернатант отделяли, добавляли воду до получения бифазной системы. Нижнюю, хлороформную фазу, содержащую сумму липидов каолина, отделяли микропипеткой и высушивали.

Извлечение фракции жирных кислот проводили путем кислого метанолиза в 4.5N HCl в сухом метаноле в течение 1.5 ч при температуре 70°C. После проведения реакции образовавшиеся метиловые эфиры жирных кислот экстрагировали гексаном, экстракт высушивали и обрабатывали в 20 мкл N,O-бис-(три-метилсилил)-трифторацетамидом для получения летучих производных оксикислот. 4 мкл реакционной смеси вводили в инжектор хроматографа для анализа. Анализ проводили в две стадии: в режиме непрерывного полного сканирования веществ пробы, элюируемых хроматографом, и в режиме селективных ионов (масс-фрагментографии). Вторая стадия потребовалась для измерения концентрации минорных компонентов жирно-кислотного состава биомассы и проводилась по специально составленной программе, позволяющей в нужное время записывать концентрацию специфических ионов маркерных веществ микроорганизмов и обходить интенсивные хроматографические пики ведущих микроорганизмов сообщества и неспецифического биологического фона.

Расчет состава микробного сообщества проводили с помощью электронных таблиц "EXCEL".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ сообщества с применением микробиологических методов. Данные количественного учета микроорганизмов и анализ продуктов метаболизма позволяют оценить развитие отдельных физиологических групп микроорганизмов в суспензии каолина при добавлении посевного материала и питательной среды. В эксперименте на 14-е сут культивирования глюкоза в среде была практически исчерпана, появились продукты метаболизма – летучие жирные кислоты (бутират – 0.2 г/л, ацетат – 0.12 г/л, пропионат – 0.03 г/л, лактат – 0.02 г/л и формиат – 0.01 г/л) (рис. 1), сероводород (6.9 мг/л) и растворимое железо (0.5 мг/л). По данным количественного учета численность аэробных гетеротрофных микроорганизмов составила 10^6 кл/г, анаэробных бродильных бактерий – 10^5 кл/г, сульфатвосстанов-



Рис. 1. Изменения химического состава суспензии каолина. 1 – глюкоза, 2 – бутират, 3 – ацетат, 4 – лактат, 5 – формиат, 6 – пропионат.

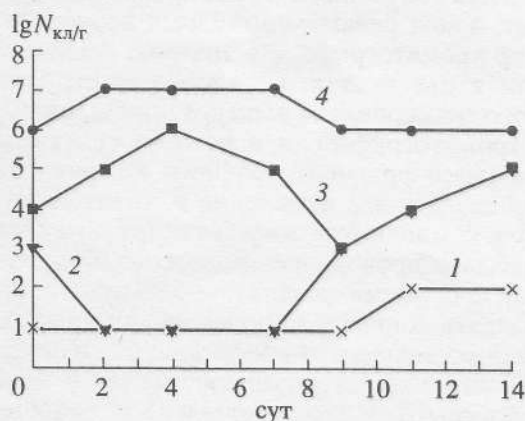


Рис. 2. Динамика численности микроорганизмов. Бактерии: 1 – железовосстанавливающие, 2 – сульфатвосстанавливающие, 3 – бродильные, 4 – аэробные гетеротрофы.

ливающих бактерий – 10^5 кл/г, железовосстанавливающих бактерий – 10^2 кл/г (рис. 2).

Анализ жирно-кислотного состава суммарной биомассы сообщества. В результате ГХ–МС анализа в метанолизате липидной фракции суммарной биомассы сообщества определено 54 вещества из класса жирных кислот, оксикислот и альдегидов (табл. 1). В таблице приведены их относительные концентрации в мол. %, а также те таксоны микроорганизмов, у которых эти вещества встречаются в составе липидов клетки. Данные приведены за вычетом содержания жирных кислот в исходном каолине. В данном случае их суммарное содержание не превышает 10% от суммы жирных кислот в опыте. Проба исходного каолина содержала 10^3 кл/г аэробных гетеротрофных бактерий, 10^2 кл/г бродильных микроорганизмов и единицы кл/г сульфатвосстанавливающих бактерий, что на два-три порядка меньше количества, вносимого с посевным материалом (рис. 2).

Некоторые специфические вещества (маркеры) охватывают крупные группы микроорганизмов. Например, метилотрофные бактерии определяются по 7,8-гексадеценной (16 : 1d7) кислоте. Микроскопические грибы определяются в целом по линолевой кислоте (октадекадиеновой, 18 : 2). Ряд бактерий можно определить до рода: *Desulfovibrio* (по изогептадеценной кислоте, i17 : 1), *Desulfobacter* (по 10-метилгексадекановой кислоте, 10Me16 : 0), *Bacteroides* (по 3-оксиизотетрадекановой, hi14) и т.д. В этом случае для характеристики сообщества используются данные типового вида. Отдельные роды, например *Pseudomonas* или *Bacillus*, гетерогенны по химическому составу, что позволяет выделять членов рода в сообществе по видовым маркерам. Так, по наличию 2-оксилауриновой кислоты (2h12 : 0) можно определить содержание микроорганизмов *Pseudomonas putida*, по антеизотридекановой кислоте (a13 : 0) – *Bacillus cereus*, а по нормальной тридекановой кислоте (13 : 0) – *B. subtilis*.

Некоторые вещества, указанные в табл. 1, характерны для всех или большинства микроорганизмов. Это пальмитиновая, стеариновая, миристиновая, олеиновая, лауриновая кислоты и некоторые другие вещества. Они неспецифичны и используются для проверочных расчетов при подведении материального баланса веществ и для выявления неучтенных в банке данных организмов.

По полученным нами данным количественного учета микроорганизмов можно предположить наличие в сообществе аэробных и факультативно-анаэробных гетеротрофных бактерий – представителей *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, а также анаэробных бактерий – представителей рода *Clostridium*, сульфатвосстанавливающих и железовосстанавливающих бактерий.

Таблица 1. Жирно-кислотный состав суммарной биомассы сообщества

Краткое обозначение	Содержание, мол. %	Характерный микроорганизм
C12:0	2.85	Большинство микроорганизмов
iC13	0.06	<i>Bacillus subtilis</i>
a13	0.24	<i>Bacillus cereus</i>
13:0	0.56	<i>Bacteroides, Bacillus, Nocardia</i>
i14	0.10	<i>Actinomyces, Bacillus, Bacteroides, Legionella, Kurthia</i>
14:1Δ9	1.27	<i>Sphaerotilus, Clostridium</i>
14:0	10.18	Большинство микроорганизмов
i15:1	0.08	<i>Desulfovibrio, Flavobacterium</i>
i15	0.45	Многие микроорганизмы
a15	0.56	Многие микроорганизмы
15:1	0.99	<i>Nitrobacter, Deinococcus, Micrococcus</i>
15:0	5.45	Большинство микроорганизмов, минорный компонент
16:1Δ7	0.37	<i>Methanogens, Deinococcus, Desulfotomaculum acetoxidans, Desulfobacterium</i>
16:1Δ9	9.42	Большинство микроорганизмов
16:1Δ11	0.37	<i>Bdellovibrio, Vibrio, Fusobacterium, Bacteroides amylophilus</i>
i16:0	0.26	<i>Actinomyces, Nocardiosis, Bacteroides, Micromonospora, Brevibacterium, Cellulomonas, Corynebacterium, Curtobacterium, Oerskovia,</i>
16:0	27.24	Большинство микроорганизмов
i17:1	0.83	<i>Desulfovibrio, Flavobacterium</i>
17:1	0.41	<i>Candida albicans, Nocardiosis, Clostridium, Methanogens</i>
i17:0	0.46	<i>Butyrivibrio, Bacillus, Prevotella, Propionibacterium</i> и другие
a17:0	0.77	<i>Corynebacterium, Bacteroides, Nocardiosis, Actinomyces, Nocardia, Micromonospora</i>
17:0	0.22	<i>Enterobacteriaceae, Pseudomonas, Desulfobacter, Desulfobacterium</i>
17:0	2.04	Большинство микроорганизмов, минорный компонент
18:2	2.79	Грибы, дрожжи, простейшие
18:1Δ9	15.25	Все организмы
18:1Δ11	3.91	<i>Nitrobacter, Bdellovibrio, Penicillium, Ruminobacter amylophilus, Succinivibrio, Campylobacter, Fusobacterium, Enterobacteriaceae, Pseudomonas, сульфатвосстанавливающие бактерии</i>
18:0	0.76	Все организмы
19:0	0.04	<i>Lactobacillus, Enterobacteriaceae, Pseudomonas, Brucella, Campylobacter</i>
19:0	0.88	<i>Nitrobacter, Burkholderia cepacia, Bacillus, Serratia</i>
20:0	1.22	<i>Actinomyces</i>
24:0	1.49	<i>Francisella, Mycobacterium</i>
i19	0.30	<i>Bacillus subtilis, Bacteroides hypermegas</i>
a19	0.30	<i>Staphylococcus</i>
10Me16	0.10	<i>Desulfobacter</i>
10Me18	0.05	<i>Mycobacterium, Nocardia, Corynebacterium, актиномицеты</i>
Окси-кислоты		
h10	0.01	<i>Pseudomonas, Thiobacillus, Leptothrix</i>
h12	0.01	<i>Pseudomonas, Neisseria gonorrhoeae, Beggiatoa, Vibrio</i>
h13	0.01	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
h13	0.01	<i>Escherichia coli, Bacteroides hypermegas, Selenomonas</i>
h14	0.03	<i>Enterobacteriaceae, Fusobacterium, Haemophilus, Wolinella, Vibrio, Campylobacter</i>
h15	0.01	<i>Bacteroides ruminicola</i>

где A_i – площадь пика вещества на хроматограмме суммарной биомассы, X_j – число клеток микроорганизма в 1 г пробы, R_{ij} – процентное содержание i -того вещества в жирно-кислотном профиле определяемого j -того микроорганизма, q – коэффициент пропорциональности, учитывающий условия анализа и чувствительность прибора: $q = 1/(q_1 q_2 S)$, где $q_1 = m_{\text{пробы}} v/V$ учитывает долю пробы, попадающей в хроматограф ($m_{\text{пробы}}$ – масса пробы, V – объем раствора на стадии силилирования пробы, v – объем раствора, введенного в хроматограф); $q_2 = Q m_0/100$ выражает массу жирно-кислотной фракции одного микроорганизма (Q – процентное содержание липидных мономеров в клетке, m_0 – масса одного микроорганизма); S – коэффициент чувствительности прибора; $S = A_{\text{станд}}/m_{\text{станд}}$, где $A_{\text{станд}}$ – площадь пика стандарта (вещества с заранее известной концентрацией), а $m_{\text{станд}}$ – количество стандарта при калибровке.

Чтобы использовать коэффициент q в уравнениях системы (1), q принимается равным для всех веществ жирно-кислотной фракции и всех учитываемых микроорганизмов.

Система имеет единственное решение при $m = n$, если уравнения независимы. В данном случае это означает неразличимость (невозможность раздельного вычисления) двух разных видов микроорганизмов с одинаковым профилем жирных кислот и альдегидов.

Решение системы имеет вид $X_j = D_j/D$, где D_j – детерминант частной матрицы коэффициентов для j -того компонента, D – детерминант системы уравнений.

Возможное число уравнений в системе равно числу компонентов жирно-кислотного пула клетки, определяемых методом хромато-масс-спектрометрии. В нашем банке данных их 150. Но у каждого микроорганизма в составе липидов насчитывается всего 10–20 веществ из этого списка. Это означает, что большинство коэффициентов R_{ij} в уравнениях системы равны нулю. Значит система вырожденная, ее можно свести к нескольким подсистемам с меньшим рангом (числом неизвестных). Так как реальное число членов известных сообществ равно 30–40, а число определяемых веществ в биомассе конкретного сообщества 70–80, то мы имеем возможность подобрать такие 30–40 уравнений, чтобы ранг подсистем был минимален. Наконец, надо учесть, что многие вещества микроорганизмов в рамках конкретного сообщества имеют ранг маркеров – представляют только один таксон. Количество таких микроорганизмов определяется по концентрации этого маркера $X_j = A_j q/R_{ij}$, тем самым сужая ранг системы в целом. Остальные микроорганизмы можно определить по заранее составленным формулам, полученным в результате

решения уравнений с двумя, иногда с тремя неизвестными.

Первым этапом расчета является определение количества микроорганизмов X_j по величинам пиков отдельных жирных кислот и альдегидов.

Вторым этапом является составление баланса для величин пиков веществ хроматограммы: $\Delta A_i = A_i - \sum X_j R_{ij}/q$.

Очевидно, что для веществ, имеющих ранг маркера, $\Delta A_i = 0$. В случае веществ, характерных для большинства или нескольких микроорганизмов, ΔA_i может оказаться отличным от нуля. Вещества с положительным балансом ΔA_i служат для выявления неучтенных в локальном банке данных микроорганизмов. Наличие веществ с отрицательным балансом ΔA_i указывает, что количество каких-либо микроорганизмов было рассчитано ошибочно. Ошибка обусловлена собственно погрешностью подготовки проб и аналитических измерений. Эта ошибка относительно невелика. Она составляет примерно 20%. Более существенная погрешность возникает из-за несоответствия состава жирных кислот микроорганизмов банка данных и изучаемого сообщества. И наконец, она может возникать при определении граматрицателных организмов по оксикислотам, которые при отмирании клеток не участвуют в процессах катаболизма и их включение в расчет приводит к завышению количества живых клеток.

Отрицательные величины ΔA_i выявлены для следующих жирных кислот: i13:0, i14:0, i15, a15, i16, 16:1Δ7, 16:1Δ9, i17:1, i17, a17, 17:0, 17:1, 3h16.

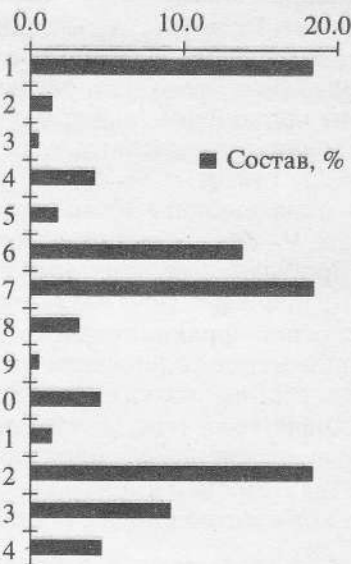
Третьим этапом является составление и решение системы уравнений для веществ с отрицательным балансом: $A_j q = \sum k_j X_j R_{ji}$, где k_j – поправочный коэффициент, учитывающий ошибку расчета количества микроорганизмов, $0 < k_j < 1$.

Например, для изотридекановой кислоты (i13:0) уравнение выглядит следующим образом: $A_{i13:0} q = 4k_{Bc} X_{Bc} + 8.1k_{Bs} X_{Bs} + 0.6k_{Db} X_{Db}$ или $750000 = 3326400k_{Bc} + 5234463k_{Bs} + 71232k_{Db}$, где k_{Bc} , k_{Bs} , k_{Db} – поправочные коэффициенты для расчета количества *Bacillus cereus*, *B. subtilis* и *Desulfobacter*. В результате реализации этого этапа из списка членов сообщества исключены микроорганизмы с $k_j = 0$. Это *Sh. putrefaciens*, *Ps. stutzeri*, *B. cereus*, *Methylococcus capsulatus* и *Enterobacter*. Для расчета количества *Arthrobacter globiformis*, *B. subtilis*, *Deinococcus*, *Desulfobacter* и *Desulfobacter* получены поправочные коэффициенты, равные 0.25, 0.14, 0.08, 0.24 и 0.37 соответственно.

Полученные коэффициенты введены в уравнения баланса. После учета вклада всех предполагаемых членов сообщества баланс концентраций дал остаточный профиль не востребуемых

Таблица 2. Структура микробного сообщества каолина Просяновского месторождения

Микроорганизм	Число, кл/г	Состав, %	
<i>Nitrobacter</i> sp.	4×10^5	18.4	1
<i>Pseudomonas putida</i>	3×10^4	1.8	2
<i>Burkholderia cepacia</i>	1×10^4	0.4	3
<i>Bacillus subtilis</i>	9×10^4	4.1	4
<i>Nocardia</i> sp.	4×10^4	1.7	5
<i>Caulobacter</i> sp.	3×10^5	13.8	6
<i>Deinococcus</i> sp.	4×10^5	18.4	7
<i>Arthrobacter globiformis</i>	7×10	3.2	8
<i>Bacteroides ruminicola</i>	8×10^3	0.4	9
<i>Desulfovibrio</i> sp.	1×10^4	4.6	10
<i>Desulfobacter</i> sp.	3×10^4	1.4	11
<i>Clostridium butyricum</i>	4×10^5	18.4	12
Штамм FeRed	2×10^5	9.2	13
Fungi	1×10^5	4.6	14
Сумма		100	



компонентов химического состава биомассы, который свидетельствует о неучтенных микроорганизмах. По определенной части остатка идентифицирована анаэробная железовосстанавливающая бактерия, выделенная параллельно из данного сообщества путем посева на плотную среду Лавли и обозначенная нами как штамм FeRed. Штамм FeRed выделен из единичной черной колонии, для него определен состав жирных кислот, опознанный в части профиля остатка суммарной биомассы по специфическому компоненту – окситридекановой кислоте (3h13), а также редко встречающимся у бактерий ненасыщенным кислотам – пентадеценной (15 : 1) и гептадеценной (17 : 1). Штамм FeRed добавлен в конечный список микроорганизмов сообщества каолина. Он отличается от известных диссимиляторных железоредукторов *Sh. putrefaciens* [19] и *G. metallireducens* [4], у которых состав жирных кислот иной. Другая часть остатка профиля жирных кислот суммарной биомассы каолина, включающая линоленовую кислоту (18 : 3) и пропорциональную ей долю профиля, относится к липидному профилю грибов. Остающийся после его вычитания набор компонентов не содержит признаков конкретных микроорганизмов и может быть определен как неспецифический биологический фон.

Структура микробного сообщества каолина.

Таким образом, анализ структуры микробного сообщества каолина, выполненный традиционными физиолого-биохимическими методами и основанный на особенностях липидного состава суммарной биомассы позволил определить родовой, а в некоторых случаях и видовой состав сообщества (табл. 2). Автотрофные бактерии пред-

ставлены *Nitrobacter* sp. Посев пробы осадка на селективную среду [20] подтвердил присутствие нитрифицирующих бактерий, осуществляющих II фазу нитрификации. Аэробные и факультативно-анаэробные гетеротрофные бактерии представлены родами *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Nocardia*, *Caulobacter*, *Deinococcus* и *Arthrobacter*. Анаэробные микроорганизмы – родами *Clostridium*, *Bacteroides*, *Desulfovibrio* и *Desulfobacter*. Идентифицированы железовосстанавливающий микроорганизм – штамм FeRed и представитель микроскопических грибов. В дальнейшем будет выясняться роль каждой группы микроорганизмов сообщества в трансформации минералов железа в каолине.

Использованный нами метод определения состава микробных сообществ по данным ГХ–МС анализа жирных кислот суммарной биомассы дал положительные результаты в применении к расшифровке сообщества микроорганизмов каолина и может послужить в дальнейшем для изучения взаимодействий микроорганизмов при биотрансформации минералов.

Авторы выражают глубокую благодарность Г.И. Каравайко за обсуждение результатов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lovley D.R. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction // Microbiol. Rev. 1991. V. 55. P. 259–287.
2. Myers C.R., Nealson K.H. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor // Science. 1988. V. 240. P. 1319–1321.

3. Lovley D.R., Phillips E.J.P., Lonergan D.J. Hydrogen and formate oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese by *Alteromonas putrefaciens* // Appl. Environ. Microbiol. 1989. V. 55. P. 700–706.
4. Lovley D.R., Giovannoni S.J., White D.C., Champine J.E., Phillips E.J.P., Gorby Y.A., Goodwin S. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals // Arch. Microbiol. 1993. V. 159. P. 336–344.
5. Lovley D.R. Magnetite formation during microbial dissimilatory iron reduction // Iron biominerals / Eds. Frankel R.B., Blakemore R.P. N.Y.: Plenum Press, 1990. P. 151–166.
6. Coleman M.L., Hedrick D.B., Lovley D.R., White D.C., Kenneth Pye. Reduction of Fe(III) in sediments by sulphate-reducing bacteria // Nature. 1993. V. 361. P. 436–438.
7. Vainshtein M., Hippe H., Kroppenstedt R.M. Cellular fatty acid composition of *Desulfovibrio* species and its use in classification of sulfate-reducing bacteria // System. Appl. Microbiol. 1992. V. 15. P. 554–566.
8. Bobbie R.J., White D.C. Characterization of benthic microbial community structure by high resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters // Appl. Environ. Microbiol. 1980. V. 39. P. 1212–1222.
9. Nichols P.D., Mancuso C.A., White D.C. Measurement of methanotroph and methanogen signature phospholipids for use in assessment of biomass and community structure in model system // Org. Geochem. 1987. V. 11. № 6. P. 451–462.
10. Осипов Г.А., Назина Т.Н., Иванова А.Е. Изучение видового состава микробного сообщества заводняемого нефтяного пласта методом хромато-масс-спектрометрии // Микробиология. 1994. Т. 63. Вып. 5. С. 876–882.
11. Авакян З.А., Платов Ю.Т., Халиуллова Р.А., Турова Е.С., Каравайко Г.И., Масленникова Г.Н., Вордьянский Ю.Н. Способ отбеливания керамических материалов. Заявка № 95116993; 11.10.95.
12. Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. 286 с.
13. Postgate J.R. Media for sulfur bacteria // Laboratory Practice. 1966. V. 15. № 11. P. 1239–1244.
14. Lovley D.R., Phillips E.J.P. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments // Appl. Environ. Microbiol. 1986. V. 51. P. 1212–1222.
15. Щербухин В.Д., Миронова Л.И., Кондырева А.В., Грюнер В.С. Определение глюкозы в патоке глюкозооксидазным методом с использованием феррицианида калия // Прикл. биохимия и микробиология. 1970. Т. 6. Вып. 4. С. 467–470.
16. Trüper H., Schlegel H. Sulfur metabolism in *Thiorhodaceae*. 1. Quantitative measurement on growing cells of *Chromatium okenii* // Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. and Serol. 1964. V. 30. № 3. P. 225.
17. Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from tissue // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497–509.
18. Осипов Г.А., Недорезова Т.П., Ходорковская В.А., Свидин Ю.В. Разработка экспресс-системы анализа состава сложных микробных сообществ с использованием масс-спектрометрических методов. Отчет о выполнении НИР по ГНТП “Экологическая безопасность России”. Проект № 7.8.4. 1992.
19. Rossello-Mora R.A., Caccavo F.Jr., Osterlehner K., Springer N., Spring S., Schuler D., Ludwig W., Amann R., Vannanueut M., Schleifer K.H. Isolation and taxonomic characterization of a halotolerant, facultatively iron-reducing bacterium // System. Appl. Microbiol. 1994. V. 17. P. 569–573.
20. Steinmuller W., Bock E. Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter. 1. Mixotrophic growth // Arch. Microbiol. 1976. V. 108. P. 299–304.

Рецензент Л.В. Калакуцкий

Structure of the Microbial Community Transforming Iron Minerals Contained in Kaolin

E. S. Turova and G. A. Osipov

Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, pr. 60-letiya Oktyabrya 7, k. 2, Moscow, 117811 Russia

Abstract—Chromatography–mass spectrometry (GC–MS) was used for rapid determination of the structure of a microbial community capable of transforming iron minerals contained in kaolin. A data bank on cellular lipid composition was created for community members revealed by routine physiological and biochemical methods. Analysis of the composition of fatty and hydroxy acids and aldehydes in the total biomass of the community by GC–MS allowed the range of community members to be determined more accurately and their cell numbers to be calculated. A system of balance equations was formed and optimized whereby the concentration of each analyzed compound was taken equal to the sum of the contributions from all members of the community possessing this compound in the composition of their cells. The calculation algorithm thus obtained provides for rapid determination of the structure of similar communities on the basis of data on the fatty acid composition of the total biomass without isolating pure cultures.