

## РАЗНООБРАЗИЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ДРЕНАЖНЫХ ВОДАХ ОТКРЫТОГО УГОЛЬНОГО КАРЬЕРА

© 2020 г. Е. В. Груздев<sup>а, \*</sup>, А. В. Белецкий<sup>а</sup>, В. В. Кадников<sup>а</sup>, А. В. Марданов<sup>а</sup>, М. В. Иванов<sup>б</sup>,  
О. В. Карначук<sup>б</sup>, Н. В. Равин<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

<sup>б</sup>Кафедра физиологии растений и биотехнологии, Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия

\*e-mail: gruevg@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.04.2020 г.

После доработки 08.05.2020 г.

Принята к публикации 30.05.2020 г.

Исследован состав микробиома дренажных вод открытого карьера, использовавшегося для добычи бурого угля. Вода имела pH 5.15 и содержала 1.4 г/л сульфата. В отличие от шахтных дренажей, образующихся при добыче сульфидных руд, содержание железа и тяжелых металлов было невысоко. Молекулярный анализ сообщества проводили с помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов генов 18S и 16S рРНК. Большинство последовательностей эукариот относилось к грибам *Basidiomycota*, также обнаружены представители *Chytridiomycota*. Доминировали базидиомицеты семейства *Sporidiobolaceae*, которых ранее обнаруживали в кислых дренажных водах. Среди минорных групп обнаружены простейшие (*Alveolata* и *Amoebozoa*) и зеленые водоросли *Chlamydomonas*. Доминирующей группой прокариот были альфа-протеобактерии *Acidiphilium*, также обнаружены бета-протеобактерии *Sulfuriferula* и *Thiomonas*.

**Ключевые слова:** ацидофилы, эукариотические микроорганизмы, кислые шахтные дренажные воды, биоразнообразие

**DOI:** 10.31857/S0026365620050109

Добыча полезных ископаемых связана с образованием большого количества шахтных дренажных вод. Классическим примером таких стоков являются широко распространенные по всему земному шару кислые шахтные дренажные воды (КШД), образующиеся в результате окисления сульфидных руд в присутствии кислорода. Характерной особенностью этих экосистем является низкое значение pH, приводящее к выведению металлов в раствор. Значения pH в КШД могут достигать 1 и даже ниже, но чаще находятся в диапазоне от 3 до 5. Обычно КШД образуются в местах добычи сульфидных руд за счет окисления оставшихся в отходах сульфидов, прежде всего, пирита ( $\text{FeS}_2$ ) и пирротина ( $\text{Fe}_{n-1}\text{S}_n$ ). Проблема КШД возникает также при добыче угля, в котором может содержаться пирит. Кислые стоки угольных шахт представляют большую экологическую проблему в некоторых регионах мира (Nicomrat et al., 2006; Brantner, Senko, 2014). Известны и примеры щелочных и нейтральных шахтных дренажей, причиной которых может быть: (1) низкое содержание сульфидных минералов; (2) присутствие моносульфидов вместо пирита; (3) большие размеры кристаллов пирита, препятствующие окислению;

(4) нейтрализация образующейся кислоты карбонатными или силикатными минералами; (5) нейтрализация кислоты природными щелочными грунтовыми водами; (6) отсутствие контакта сульфидных минералов и циркулирующей воды; (7) отсутствие кислорода при восстановленных условиях и др. (Banks et al., 2002).

Интерес к организмам, способным развиваться в КШД, вызван рядом причин. Во-первых, это фундаментальные исследования механизмов адаптации к низким pH и высокому содержанию металлов. Стоит отметить, что подобные техногенным КШД биотопы формируются и в местах вулканической активности, что, по мнению ряда ученых, может отражать условия ранних этапов развития Земли (Aguilera, 2013). Второй причиной интереса к КШД является их роль как источника загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами и мышьяком, содержание которых может достигать граммов на литр (Glukhova et al., 2018). Задача очистки таких стоков перед сбросом в водоемы актуальна для горнодобывающей промышленности. Микроорганизмы, обитающие в КШД, являются перспективными объектами для разработки новых биотехнологических подходов

биоремедиации окружающей среды и извлечения ценных цветных металлов из КШД (Kaksonen et al., 2008).

Ранее считалось, что в экстремальных условиях КШД способны обитать только прокариоты, поэтому большинство исследований были сфокусированы на ацидофильных археях и бактериях. Позднее было показано, что в КШД наряду с прокариотами, присутствуют и эукариотические микроорганизмы, среди которых были обнаружены грибы, микроскопические водоросли и простейшие (Méndez-García et al., 2015; Mesa et al., 2017). Большую часть эукариотических микроорганизмов представляют грибы, относящиеся к аскомицетам (*Ascomycota*) и базидиомицетам (*Basidiomycota*), которые играют важную роль в экосистеме КШД, абсорбируя металлы. Ацидофильные грибы обладают различными механизмами устойчивости к низким рН и тяжелым металлам, что делает их модельными объектами для изучения механизмов адаптации к экстремальным условиям КШД. Они также являются перспективными объектами для разработки новых методов биоремедиации окружающей среды (Verma, Sharma, 2017).

Однако, несмотря на интерес к эукариотам в КШД, данные об их биоразнообразии весьма ограничены и в основном получены в результате исследования реки Рио Тинто (RioTinto) в Испании (Amaral Zettler et al., 2002), также имеются данные для Iron Mountain в США (Baker et al., 2004; 2009), Xiang Mountain в Китае (Hao et al., 2010), шахт Königstein в Германии (Zirnstein et al., 2012) и полиметаллических месторождений в Забайкалье (Glukhova et al., 2018; Кадников и соавт., 2019).

Несмотря на то, что основное внимание при изучении микроорганизмов КШД сосредоточено на местах добычи сульфидов металлов, угольные шахты и карьеры также представляют источник кислых вод. Стоки угольных карьеров отличаются от полисульфидных месторождений более низкими концентрациями металлов. Эукариотические обитатели угольных КШД остаются практически неизученными (Соколянская и соавт., 2020).

Целью работы является изучение состава сообщества эукариотических микроорганизмов в дренажных водах открытого карьера добычи бурого угля.

Объектом исследования был открытый водоем, образованный в результате стока дренажных вод со склонов открытого карьера, ранее использовавшегося для добычи бурого угля. Карьер является следствием непромышленной добычи угля Талды-Дюргунского бурогоугольного месторождения, находящегося на западной окраине Чуйской впадины в 5 км южнее села Чаган-Узун в Кош-Агачском районе Республики Алтай. Водоем периодически наполняется водой во время дождей

и на момент отбора проб в августе 2019 г. представлял собой небольшое озеро площадью около 10 кв. метров и глубиной до 30 см.

Физико-химические параметры воды, рН, температуру и окислительно-восстановительный потенциал измеряли рН-метром HI183141 ("Hanna Instruments"). Элементный состав воды определяли масс-спектрометрией с индуктивно связанной плазмой как описано ранее (Mardanov et al., 2016). Физико-химические характеристики исследуемого образца воды представлены в табл. 1. Вода имела относительно низкий рН (5.15), а среди анионов был обнаружен сульфат, в меньших концентрациях присутствовали нитрат и хлорид. Высокое содержание сульфата, около 1.5 г/л, отчасти связано с присутствием в месторождении гипсовых прослоев, которые по мощности и толщине сопоставимы со слоями угля. Ранее мы зафиксировали присутствие гипса, наряду с другими вторичными сульфатами, непосредственно в пробах грунтов исследованного карьера методом дифракционного анализа (Kadnikov et al., 2018). Сульфаты также могут образовываться в результате окисления элементной серы, обнаруженной в угле (Kadnikov et al., 2018), что связано с выделением протонов и снижением рН. В отличие от многих других месторождений угля, содержание железа в пробе воды было невелико и составляло 1.23 мг/л. Низкая концентрация железа может быть связана с низким содержанием сульфидов железа в угле. Мы не обнаружили сульфидов при проведении минералогического анализа, в породах железо присутствовало в виде вторичных сульфатов или оксида гематита ( $Fe_2O_3$ ). Однако присутствие нерастворимых вторичных сульфатов и оксидов железа является однозначным доказательством присутствия сульфидов в пластах до начала их разработки и окисления.

Для характеристики состава микробного сообщества отбирали пробу воды (5 л), микроорганизмы концентрировали фильтрацией через мембранный фильтр с размером поры 0.22 мкм. Фильтр с зафиксированной на нем биомассой растирали в жидком азоте. Для выделения суммарной ДНК использовали набора DNeasy Power Soil kit ("Qiagen"), следуя протоколам производителя.

Состав эукариотического сообщества определяли на основании анализа последовательностей варибельного региона V4 гена 18S рРНК, амплифицированного с помощью ПЦП с использованием праймеров V4\_1F (5'-CCA GCA SCY GCG GTA ATW CC) и TAREukREV3 (5'-ACT TTC GTT CTT GAT YRA) (Bass et al., 2016). Полученные ПЦП-фрагменты использовали для приготовления библиотеки для секвенирования с помощью наборов Nextera XT DNA Library Prep Kit ("Illumina", США) по протоколам производителя. Полученные

библиотеки секвенировали на MiSeq (“Illumina”) с использованием наборов MiSeq Reagent Kit V3 (в формате парных чтений 2 × 300 нт). Полученные пересекающиеся чтения объединяли с помощью программы FLASH v 1.2.11 (Magoč, Salzberg, 2011), в результате получено 32504 последовательностей V4 районов 18S рРНК. Эти последовательности кластеризовали в оперативные таксономические единицы (ОТЕ) на уровне 97% идентичности и удаляли химеры с помощью программы Usearch. Таксономическую идентификацию ОТЕ проводили с помощью классификатора SINA по базе последовательностей рРНК SILVA с параметрами по умолчанию (Pruesse et al., 2012). Также для таксономической идентификации ОТЕ проводили поиск ближайших последовательностей генов 18S рРНК в GenBank с помощью BLASTN. Аналогичным образом определяли состав сообщества прокариот, для амплификации вариативного участка V3–V4 гена 16S рРНК использовали “универсальные” праймеры PRK341F (5'-CCT ACG GGR BGC ASC AG-3') и PRK806R (5'-GGA CTA CYV GGG TAT CTA AT-3').

Нуклеотидные последовательности фрагментов генов 18S рРНК и 16S рРНК депонированы в базу данных Sequence Read Archive NCBИ под номерами SRX8286754 и SRX8286755 соответственно (BioProject PRJNA630849).

Разнообразие эукариотического сообщества было низким, обнаружено всего 20 ОТЕ (табл. 2). Необходимо отметить, что в отличие от анализа состава прокариотических сообществ, доли отдельных ОТЕ в общем числе определенных последовательностей фрагментов генов 18S рРНК дают лишь приблизительную оценку относительной численности различных групп эукариот, поскольку число копий генов рРНК в геномах эукариот велико и может отличаться у разных таксонов.

Абсолютное большинство полученных последовательностей генов 18S рРНК (87.3%) относилось к грибам, в основном филума *Basidiomycota* (81.7%), также были обнаружены *Chytridiomycota* (5.6%). Базидиомицеты были представлены родами *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Slooffia*, *Aecidium*, *Cystobasidium* и *Phaeotremella*, хитридиомицеты – родами *Fimicolochytrium*, *Geranomycetes*, *Spizellomyces* и *Rhizophlyctis*. Примерно по 4% последовательностей приходилось на представителей простейших – *Alveolata* (в основном род *Platyophrya*) и *Amoebozoa* (в основном род *Tubulinea*). Около 0.24% последовательностей представляли зеленые водоросли рода *Chlamydomonas*. Две ОТЕ относились к почвенным клещам семейства *Bdellidae* (1.18%) и высшим растениям (0.73%). Вероятнее всего, биоматериал этих организмов попал в водоем при стоке воды со склонов карьера. Около 2.5% последовательностей относилось к трем ОТЕ, филогенетически далеким от известных эукариот.

**Таблица 1.** Физико-химический состав пробы воды

Характеристика	Значение
Температура, °С	21
pH	5.15
<i>Eh</i> , mV	+190
Содержание элементов и основных анионов в мг/л:	
Ca	322
Mg	135
Na	52.9
K	15.2
Mn	3.22
Si	3.16
Fe	1.23
Al	1.00
Zn	0.25
Ni	0.23
Cu	0.014
SO <sub>4</sub>	1411.3
NO <sub>3</sub>	117.9
Cl	15.5

Доминирующей таксономической группой эукариот в исследуемом сообществе являются дрожжи рода *Rhodospiridium* (ОТЕ1, 78.9% последовательностей генов 18S рРНК), еще 0.9% представляла ОТЕ20 рода *Rhodotorula* того же семейства *Sporidiobolaceae*. Известно, что представители *Sporidiobolaceae* являются эврибионтами, в том числе и экстремофилами, устойчивыми к низким значениям pH (Su et al., 2019). Представители *Rhodotorula* были обнаружены в водах реки RioTinto в условиях умеренно низкого pH (Gadanhо et al., 2006). В RioTinto также были обнаружены последовательности, близкие к найденным нами водорослям рода *Chlamydomonas* (ОТЕ7) и к ОТЕ6, представляющую удаленную от известных изолятов филогенетическую линию *Cercozoa* (*Rhizaria*; *Cercozoa*). Присутствие *Chlamydomonas* описано и в других КШД (Das et al., 2009). Обычно ацидофильные *Chlamydomonas* выступают в качестве первичных продуцентов, однако в исследованном нами образце их доля в сообществе мала. Другие ацидофильные организмы, родственные обнаруженным нами базидиомицетам рода *Phaeotremella*, были обнаружены в кислых водах из пещеры Морассина–Шмидефельд, Германия (Bugow et al., 2019).

Некоторые из обнаруженных в исследуемом образце эукариотических микроорганизмов потенциально могут участвовать в процессах очистки шахтных вод. Описано, что представители *Rhodotorula* могут участвовать в процессе удале-

Таблица 2. Относительная численность и таксономическая классификация ОТЕ эукариот

ОТЕ	Доля, %*	Ближайшая последовательность 18S рРНК из GenBank**	Номер в GenBank	Идентичность, %	Таксономия
1	78.9	<i>Rhodosporidium toruloides</i> ***	DQ647614	99.52	Fungi; Basidiomycota; Sporidiobolaceae
20	0.9	<i>Rhodotorula araucariae</i>	KJ708435	99.28	Fungi; Basidiomycota; Sporidiobolaceae
5	0.9	<i>Slooffia cresolica</i>	KJ708365	98.80	Fungi; Basidiomycota; Chrysozymaceae
12	0.5	<i>Aecidium kalanchoes</i>	DQ354524	99.28	Fungi; Basidiomycota; Puccinialesincertaesedis
18	0.3	<i>Cystobasidium laryngis</i>	MH047192	99.28	Fungi; Basidiomycota; Cystobasidiaceae
16	0.2	<i>Phaeotremella</i> sp. strain GaoanC191	MN450768	98.55	Fungi; Basidiomycota; Phaeotremellaceae
3	4.1	<i>Fimicolochytrium alabamae</i>	HQ901748	99.29	Fungi; Chytridiomycota; Powellomycetaceae
8	0.7	<i>Geranomyces variabilis</i>	AH009023	99.52	Fungi; Chytridiomycota; Powellomycetaceae
9	0.5	<i>Spizellomyces pseudodichotomus</i>	GQ499384	99.76	Fungi; Chytridiomycota; Spizellomycetaceae
19	0.3	<i>Rhizophlyctis rosea</i>	GQ160454	97.85	Fungi; Chytridiomycota; Rhizophlyctidaceae
2	4.1	<i>Platyophrya bromelicola</i>	EU039905	97.79	Alveolata; Ciliophora; Platyophryidae
13	0.04	<i>Leptopharynx costatus</i>	EU286811	99.01	Alveolata; Ciliophora; Microthoracidae
10	3.3	<i>Tubulinea</i> group 04	JQ271789	88.24	Amoebozoa; Tubulinea; unclassified Tubulinea
17	0.6	<i>Micriamoeba</i> sp. strain BSA-02190017	MH643883	83.75	Amoebozoa; Tubulinea; Echinamoebida
7	0.2	<i>Chlamydomonas pitschmannii</i>	LC412910	99.28	Viridiplantae; Chlorophyta; Chlamydomonadaceae
14	0.7	<i>Lactuca ludoviciana</i>	KT179675	98.80	Viridiplantae; Streptophyta; Asteraceae
15	1.2	<i>Bdellidae</i> sp. 2 KG-2006	DQ648874	89.69	Metazoa; Arthropoda
4	1.7	Uncultured soil eukaryote clone h737	MK946030	76.68	
6	0.7	Uncultured cercozoan clone G2_18E_51	EF441984	97.56	
11	0.1	Uncultured soil eukaryote clone h737	MK946030	81.41	

\* Доля ОТЕ от всех последовательностей генов 18S рРНК.

\*\* Ближайший изолят, при отсутствии последовательностей с идентичностью выше 80% указана ближайшая последовательность из GenBank.

\*\*\* Такой же уровень идентичности с 18S рРНК *Rhodotorula sinensis* AS2.1389 и *Rhodosporidiobolus* sp. strain MCA5570.

ния из воды ионов Cd(II), способного образовывать токсичные соединения (Roşca et al., 2018). Устойчивость к повышенному содержанию Cr(VI), Cd(II) и Cu(II) описана и у представителей рода *Cystobasidium* (Martorell et al., 2019).

В результате молекулярного анализа сообщества прокариот было установлено, что в нем до-

минируют альфа-протеобактерии рода *Acidiphilium* (44% последовательностей генов 16S рРНК). Бактерии этого рода – аэробные хемоорганотрофы (Okamura et al., 2015), часто встречающихся в КШД с умеренно низкими pH (2–5) и не экстремально высоким содержанием металлов (Méndez-García et al., 2015). Бета-протеобактерии родов *Sul-*

*furiferula* и *Thiomonas* составляли, соответственно, 15 и 4% сообщества. Эти серо-окисляющие хемолитоавтотрофные бактерии ранее обнаруживали в КШД (Méndez-García et al., 2015). Также были найдены протеобактерии семейств *Beijerinckiaceae*, *Acetobacteraceae*, *Nitrosomonadaceae*, *Rhodanobacteraceae*.

Таким образом, анализ состава сообщества эукариот исследованного КШД показал присутствие в нем как организмов, обнаруженных в КШД из других географически удаленных регионов, так и групп, ранее не описанных в КШД. Состав эукариот указывает на то, что они представляют гетеротрофную часть всего микробного сообщества, поскольку доля единственной автотрофной группы, *Chlamydomonas*, в сообществе невелика. Среди прокариот также преобладали гетеротрофы. Повидимому, в этой экосистеме органические вещества в основном поступают извне вместе с притоком воды, также оно может образовываться в результате деятельности хемолитоавтотрофных серо-окисляющих бактерий.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работы выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках проектов 18-34-00356 (молекулярный анализ микробного сообщества) и 19-04-00981 (физико-химический анализ воды).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

Вклад авторов: Е.В. Груздев и А.В. Белецкий – анализ последовательностей генов 18S рРНК, подготовка статьи; В.В. Кадников и А.В. Марданов – отбор образцов, выделение метагеномной ДНК и секвенирование; М.В. Иванов – физико-химический анализ образцов; О.В. Карначук – отбор образцов, анализ данных; Н.В. Равин – анализ данных и подготовка статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Кадников В.В., Груздев Е.В., Ивасенко Д.А., Белецкий А.В., Марданов А.В., Данилова Э.В., Карначук О.В., Равин Н.В. Селекция микробного сообщества при формировании кислого шахтного дренажа // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 309–317.  
Kadnikov V.V., Gruzdev E.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Ravin N.V., Ivashenko D.A., Karnachuk O.V., Danilova E.V. Selection of a microbial community in the course of forma-

tion of acid mine drainage // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 292–299.

Соколянская Л.О., Иванов М.В., Иккерт О.П., Калинина А., Евсеев В.А., Глухова Л.Б., Карначук О.В. Осаждение меди в нерастворимые оксалаты термофильными *Aspergillus* spp., выделенными из горящих отходов добычи угля // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 493–497.

Sokolyanskaya L.O., Ivanov M.V., Ikkert O.P., Kalinina A.E., Evseev V.A., Glukhova L.B., Karnachuk O.V. Copper precipitation as insoluble oxalates by thermotolerant *Aspergillus* spp. from burning wastes of coal mining // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 498–501.

Aguilera A. Eukaryotic organisms in extreme acidic environments, the Río Tinto case // Life (Basel). 2013. V. 3. P. 363–374.

Amaral Zettler L.A., Gómez F., Zettler E., Keenan B.G., Amils R., Sogin M.L. Microbiology: eukaryotic diversity in Spain's River of Fire // Nature. 2002. V. 417. P. 137.

Baker B.J., Lutz M.A., Dawson S.C., Bond P.L., Banfield J.F. Metabolically active eukaryotic communities in extremely acidic mine drainage // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 6264–6271.

Baker B.J., Tyson G.W., Goosherst L., Banfield J.F. Insights into the diversity of eukaryotes in acid mine drainage biofilm communities // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 2192–2199.

Banks D., Parnachev V.P., Frengstad B., Holden W., Vedernikov A.A., Karnachuk O.V. Alkaline mine drainage from metal sulphide and coal mines: examples from Svalbard and Siberia // Mine Water Hydrogeology and Geochemistry / Eds. Younger P.L., Robins N.S. London: Geological Society, 2002. P. 287–296.

Bass D., Silberman J.D., Brown M.W., Pearce R.A., Tice A.K., Jousset A., Geisen S., Hartikainen H. Coprophilic amoebae and flagellates, including *Guttulinopsis*, *Rosculus* and *Helkesimastix*, characterise a divergent and diverse rhizarian radiation and contribute to a large diversity of faecal-associated protists // Environ. Microbiol. 2016. V. 18. P. 1604–1619.

Brantner J.S., Senko J.M. Response of soil-associated microbial communities to intrusion of coal mine-derived acid mine drainage // Environ. Sci. Technol. 2014. V. 48. P. 8556–8563.

Burow K., Grawunder A., Harpke M., Pietschmann S., Ehrhardt R., Wagner L., Voigt K., Merten D., Büchel G., Kothe E. Microbiomes in an acidic rock-water cave system // FEMS Microbiol. Lett. 2019. V. 366. pii: fnz167. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz167>

Das B.K., Roy A., Koschorreck M., Mandal S.M., Wendt-Potthoff K., Bhattacharya J. Occurrence and role of algae and fungi in acid mine drainage environment with special reference to metals and sulfate immobilization // Water Res. 2009. V. 43. P. 883–894.

Gadanhó M., Libkind D., Sampaio J.P. Yeast diversity in the extreme acidic environments of the Iberian Pyrite Belt // Microb. Ecol. 2006. V. 52. P. 552–563.

Glukhova L.B., Frank Y.A., Danilova E.V., Avakyan M.R., Tuovinen O.H., Karnachuk O.V. Isolation, characterization, and metal response of novel, acid tolerant *Penicillium* spp. from extremely metal-rich waters at a mining site in Transbaikalia (Siberia, Russia) // Microb. Ecol. 2018. V. 76. P. 911–924.

- Hao Ch., Wang L., Gao Ya., Zhang L., Dong H. Microbial diversity in acid mine drainage of Xiang Mountain sulfide mine, Anhui Province, China // *Extremophiles*. 2010. V. 14. P. 465–474.
- Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Ivasenko D.A., Antsiferov D.V., Beletsky A.V., Karnachuk O.V., Ravin N.V. Lignite coal burning seam in the remote Altai Mountains harbors a hydrogen-driven thermophilic microbial community // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. Art. 6730.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-25146-9>
- Kaksonen A.H., Dopson M., Karnachuk O., Tuovinen O.H., Puhakka J.A. Biological iron oxidation and sulfate reduction in the treatment of acid mine drainage at low temperatures // *Psychrophiles: From biodiversity to biotechnology* / Eds. Margesin R., Schinner F., Marx J.C., Gerday C. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2008. P. 429–454.
- Magoč T., Salzberg S.L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. P. 2957–2963.
- Mardanov A.V., Panova I.A., Beletsky A.V., Avakyan M.R., Kadnikov V.V., Antsiferov D.V., Banks D., Frank Y.A., Pimenov N.V., Ravin N.V., Karnachuk O.V. Genomic insights into a new acidophilic, copper-resistant *Desulfosporosinus* isolate from the oxidized tailings area of an abandoned gold mine // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2016. V. 92. pii. fiw111.
- Martorell M.M., Ruberto L.A.M., de Castellanos L.I.F., Mac Cormack W.P. Bioremediation abilities of Antarctic fungi // *Fungi in extreme environments: ecological role and biotechnological significance* / Eds. Tiquia-Arashiro S.M., Grube M. Cham, Switzerland: Springer, 2019. P. 517–534.
- Mendez-Garcia C., Pelaez A.I., Mesa V., Sanchez J., Golyshtina O.V., Ferrer M. Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats // *Front. Microbiol.* 2015. V. 29. Art. 475.
- Mesa V., Gallego J.L.R., González-Gil R., Lauga B., Sánchez J., Méndez-García C., Peláez A.I. Bacterial, Archaeal, and Eukaryotic diversity across distinct microhabitats in an acid mine drainage // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 1756.
- Nicomrat D., Dick W.A., Tuovinen O.H. Microbial populations identified by fluorescence *in situ* hybridization in a constructed wetland treating acid coal mine drainage // *J. Environ. Qual.* 2006. V. 35. P. 1329–1337.
- Okamura K., Kawai A., Wakao N., Yamada T., Hiraishi A. *Acidiphilium iwatense* sp. nov., isolated from an acid mine drainage treatment plant, and emendation of the genus *Acidiphilium* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. V. 65. P. 42–48.
- Pruesse E., Peplies J., Glöckner F.O. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes // *Bioinformatics*. 2012. V. 28. P. 1823–1829.
- Roşca M., Hlihor R.M., Cozma P., Drăgoi E.N., Diaconu M., Silva B., Tavares T., Gavrilăscu M. Comparison of *Rhodotorula* sp. and *Bacillus megaterium* in the removal of cadmium ions from liquid effluents // *Green Process. Synth.* 2018. V. 7. P. 74–88.
- Su X., Zhou M., Hu P., Xiao Y., Wang Z., Mei R., Hashmi M.Z., Lin H., Chen J., Sun F. Whole-genome sequencing of an acidophilic *Rhodotorula* sp. ZM1 and its phenol-degrading capability under acidic conditions // *Chemosphere*. 2019. V. 232. P. 76–86.
- Verma N., Sharma R. Bioremediation of toxic heavy metals: a patent review // *Recent Pat. Biotechnol.* 2017. V. 1. P. 171–187.
- Zirnstein I., Arnold T., Krawczyk-Barsch E., Jenk U., Bernhard G., Roske I. Eukaryotic life in biofilms formed in a uranium mine // *MicrobiologyOpen*. 2012. V. 1. P. 83–94.  
<https://doi.org/10.1002/mbo3.17>

## Diversity of Eukaryotic Microorganisms in the Drainage Waters of a Coal Open-Cast Mine

E. V. Gruzdev<sup>1,\*</sup>, A. V. Beletsky<sup>1</sup>, V. V. Kadnikov<sup>1</sup>, A. V. Mardanov<sup>1</sup>, M. V. Ivanov<sup>2</sup>, O. V. Karnachuk<sup>2</sup>, and N. V. Ravin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

<sup>2</sup>*Department of Plant Physiology and Biotechnology, Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia*

\*e-mail: [gruevg@yandex.ru](mailto:gruevg@yandex.ru)

Received April 23, 2020; revised May 8, 2020; accepted May 30, 2020

The composition of the microbiome of acid drainage water of a quarry used for the mining of brown coal was studied. The water had a pH of 5.15 and contained 1.4 g/L of sulfate. Unlike acid mine drainage associated with mining of sulfide ores, the content of iron and heavy metals was low. Molecular analysis of the microbial community was performed by high-throughput sequencing of the 18S and 16S rRNA gene fragments. Most eukaryotic sequences belonged to the fungal phylum *Basidiomycota*; members of the *Chytridiomycota* were also found. Basidiomycetes of the family *Sporidiobolaceae* were the predominant group, as was previously reported for acid mine drainage waters. Among the minor groups, protozoa (*Alveolata* and *Amoebozoa*) and green algae (*Chlamydomonas*) were found. The dominant group of prokaryotes was the genus *Acidiphilium* (*Alphaproteobacteria*); betaproteobacteria of the genera *Sulfuriferula* and *Thiomonas* were also found.

**Keywords:** acidophiles, eukaryotic microorganisms, acid mine drainage, biodiversity