

Сведения о ходе выполнения проекта  
**«Получение штаммов-продуцентов сульфидов металлов из кислых отходов  
добычи полиметаллических руд на основе метагеномного анализа»**

Руководитель д-р биол. наук, профессор Карначук О.В.

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии от «07» августа 2014 г. № 14.575.21.0067 с Минобрнауки России в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» на этапе № 2 в период с 07.08.2014 по 31.12.2014 выполнялись следующие работы:

За счет бюджетных средств:

1. Анализ метагеномных данных, полученных в результате секвенирования сообщества микроорганизмов шахтных вод.
2. Поиск с помощью методов биоинформатики в метагеномных данных последовательностей генов 16S рибосомальных РНК и функциональных генов, родственных сульфидогенным микроорганизмам.
3. Экспресс-анализ консорциумов ацидофильных сульфидогенных микроорганизмов методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ).
4. Сопоставление полученных результатов ДГГЭ с данными метагеномного анализа.
5. Проведение работ по определению возможных молекулярных механизмов устойчивости к низким рН и тяжелым металлам.
6. Подведение итогов этапа ПНИ и разработка отчетной документации.

За счет внебюджетных средств:

7. Проведение дополнительных исследований по анализу биоразнообразия консорциумов ацидофильных сульфидогенных микроорганизмов.

При этом были получены следующие результаты:

Полученные на первом этапе метагеномные данные для пробы ШГ-14-3 были проанализированы и собраны в контиги. В результате было обнаружено 8104 потенциальных белок-кодирующих генов. Из них 1731 не имеют гомологов в международных базах данных GO, IMG, KEGG, NCBI (RefSeq & GeneBank). Анализ таксономического распределения предсказанных белок-кодирующих генов показал, что большинство белков в метагеноме имеет ближайших гомологов, относящихся к организмам филума *Proteobacteria*. Следующая по численности группа белков имела ближайших гомологов - представителей филумов *Actinobacteria* и *Acidobacteria*. Представители всех выявленных филогенетических групп могут быть обнаружены в местах обитания с низким рН. Анализ распределения GC-состава в собранных

контигах может указывать на то, что в данном сообществе присутствуют как минимум две группы микроорганизмов с существенно отличающимся GC-составом.

Анализ метагеномных данных на основании последовательностей генов 16S рРНК с использованием программы RNAmmer показывает, что в сообществе ШГ-14-3 доминирует один вид, имеющий высокое сходство по последовательности генов 16S рРНК с некультивируемым бактериями, которые ранее были обнаружены в кислых шахтных водах Китая. Филогенетический анализ показал, что доминирующий микроорганизм близок железокисляющей бактерии *Gallionella capsiferriformans* (сходство последовательностей составляет 89%), относящейся к филуму *Betaproteobacteria*. С помощью анализа отдельных чтений удалось выявить минорные компоненты сообщества, к которым относятся представители семейства *Nitrospiraceae*, *Streptococcaceae*, *Alicyclobacillaceae* и др. Также анализ метагеномных данных выявил в метагеноме гены сульфитредуктазы (*dsrA* и *dsrB*), которые участвуют в процессах диссимиляционной сульфатредукции. Данные гены были близки железокисляющим бетапротееобактериям *Sideroxydans lithotrophicus* (89%) и *Ferriphaselus amnicola* (85%), соответственно.

Также на основе метагеномного анализа определены возможные молекулярные механизмы устойчивости к низким рН и тяжелым металлам. В метагеноме ШГ-14-3 были найдены возможные АТФазы, транспортирующие протоны. Обнаружены последовательности, кодирующие белки гомеостаза металлов, такие как медные АТФазы Р-типа, выкачивающие одновалентные медь и серебро из клетки, так и цинковые, переносящие двухвалентные цинк, свинец, кадмий, и ртуть. Также присутствовали многочисленные RND-транспортеры, опероны, обеспечивающие устойчивость к мышьяку и хрому.

Методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ) было исследовано филогенетическое разнообразие микробных сообществ ацидофильных сульфидогенных накопительных культур. Во всех исследованных накопительных культурах (ШГ-14-1, NP и BG) были обнаружены последовательности генов 16S рРНК СРБ, родственных спорообразующим представителям *Desulfosporosinus*. В культуре ШГ-14-1 также выявлена уникальная последовательность, наиболее близкая СРБ *Desulfotomaculum gibsoniae* и *Desulfurispora thermophila*. Сравнительный анализ результатов ДГГЭ и метагеномных данных показал, что культивируемые флотипы отличались от последовательностей, обнаруженных с помощью метагеномного анализа. Анализ ПЦР-ДГГЭ показал, что в большинстве накопительных культур доминировали спорообразующие сульфидогены рода *Desulfosporosinus*. В то же время, метагеномные данные по гену 16S рРНК не выявили присутствия бактерий этого рода в исследуемой экосистеме. Однако в метагеномных данных белковой последовательности, наиболее близкой СРБ *Desulfosporosinus youngiae* позволяет предположить, что бактерии этого рода являются минорными компонентами микробного сообщества в исследованной экосистеме, но, вероятно, имеют преимущество при культивировании в условиях низких рН и высоких концентраций металлов. Анализ метагеномных данных по гену 16S рРНК показал присутствие

только одной филогенетической группы, у которой может присутствовать способность к диссимиляционному восстановлению сульфата. Это удаленные родственники семейства *Desulfobacteraceae*, все культивируемые представители которого являются сульфатредукторами. ПЦР-ДГГЭ анализ накопительных культур, обладающих способностью диссимиляционно восстанавливать сульфат, не выявил аналогичных филоотипов-удаленных родственников *Desulfobacteraceae*. Однако гомологичные филоотипы были обнаружены, когда метод ПЦР-ДГГЭ был использован для анализа доминирующих филоотипов в воде подземных горизонтов (проба ШГ-14-1).

ДГГЭ-анализ проведен для проб осадков ШГ-14-2, ШГ-14-8 и БГ-1, и воды из проб ШГ-14-1 и ШГ-14-3. Значительная часть обнаруженных филоотипов относилась к ацидофильным железо- и серуокисляющим бактериям. Филоотипы, родственные СРБ, были выявлены в пробах ШГ-14-1 (ближайший родственник *Desulfobulbus mediterraneus* класса *Deltaproteobacteria*) и ШГ-14-3 (*Desulfosporosinus meridiei* и *Desulfosporosinus orientis* отдела *Firmicutes*). Проведенный ДГГЭ-анализ исходных проб позволил оценить разнообразие микробных сообществ и выявил представителей СРБ в пробах ШГ-14-1 и ШГ-14-3. Большой интерес представляет обнаружение филоотипов, родственных неспоровым СРБ, которые могут принадлежать новым сульфидогенным микроорганизмам.

На основании полученных данных реконструирован метаболизм исследуемого микробного сообщества в пробе ШГ-14-3. Так, основным процессом в сообществе является окисление железа (II) с использованием кислорода микроорганизмами семейства *Gallionellaceae* и рода *Acidithiobacillus*. Также может осуществляться анаэробный процесс восстановления железа (III), в котором принимает участие *Acidithiobacillus ferrivorans* в процессе диссимиляционной железоредукции. В метагеномных данных были обнаружены организмы, способные деградировать различные сахара и полимерные соединения углерода (*Acidobacterium*), и организм близкий к дельтапротеобактерии рода *Syntrophus*, который может сосуществовать в синтрофном сообществе с сульфатредуцирующими бактериями и деградировать жирные и ароматические кислоты. Представителями сообщества СРБ в пробе ШГ-14-3 являются спорообразующие бактерии, родственные *Desulfosporosinus* и *Desulfotomaculum*, относящиеся, вероятно, к минорному компоненту сообщества. Также могут присутствовать другие потенциальные сульфидогены из класса *Deltaproteobacteria*.

Кроме того, проведены дополнительные работы по получению новых накопительных культур ацидофильных сульфидогенных микроорганизмов. Получены новые ацидофильные и ацидотолерантные накопительные культуры из проб ШГ-14-1, ШГ-14-8, а также ШГ-14-4 и ШГ-14-5, отобранных с Акатуйского месторождения в Забайкальском крае. Наиболее перспективными для дальнейших исследований являются накопительные культуры ШГ-14-4 и ШГ-14-5 на разных органических субстратах роста (лактат, этанол, ацетат, глицерин и пептон), которые характеризовались короткой продолжительностью лаг-фазы и большим

морфологическим разнообразием типов клеток, а также накопительные культуры ВГ и NP, способные к росту при низких начальных рН среды и характеризующиеся присутствием фило типов СРБ.

В ходе проведения работ по ПНИ использовались стандартизированные методики и метрологическое обеспечение. Проведенные за отчетный период работы соответствуют план-графику исполнения обязательств по проекту. Полученные результаты соответствуют техническим требованиям к выполняемому проекту.