

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 № № 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 № 4 в период с 01.01.20165 по 30.06.2016 выполнялись следующие работы:

За счет бюджетных средств:

1 Проведение работ по выделению ДНК из наиболее биотехнологически перспективных штаммов ацидофильных сульфидогенных микроорганизмов

2 Секвенирование и анализ полных геномов биотехнологически перспективных штаммов ацидофильных сульфидогенных микроорганизмов

3 Поиск генетических механизмов устойчивости к низким рН и металлам в геномах биотехнологически перспективных штаммов ацидофильных сульфидогенных микроорганизмов

4 Проведение лабораторных исследований для подтверждения полученных геномных данных:

- изучение устойчивости к металлам и определение предельных концентраций металлов для роста штаммов ацидофильных сульфидогенных микроорганизмов, в геномах которых обнаружены гены устойчивости к металлам

- исследование диапазона рН для роста и определение минимальных значений рН для штаммов, в геномах которых выявлены генетические механизмы, свойственные ацидофильным микроорганизмам

5 Подведение итогов этапа ПНИ и разработка отчетной документации.

За счет внебюджетных средств:

1 Проведение работ по культивированию штаммов и консорциумов ацидофильных сульфидогенных микроорганизмов при высоком содержании ионов меди и других металлов в ростовой среде

2 Получение сульфидов металлов в экспериментах со штаммами и/или консорциумами ацидофильных сульфидогенных микроорганизмов, подготовка биогенного осадка для материаловедческого анализа методами сканирующей электронной микроскопии, совмещенной с элементным анализом и рентгенофазовым анализом

3 Проведение маркетинговых исследований с целью изучения перспектив коммерциализации РИД, полученных при выполнении ПНИ

4 Проведение дополнительных патентных исследований и подготовка заявки на

получение патента

При этом были получены следующие результаты:

В ходе выполнения работ по проекту секвенирован драфт-геном нового ацидофильного штамма *Desulfosporosinus* sp. BG. Общий объем данных составил более 189 млн. п.о. со средней длиной чтений 495 п.о. Размер полученного генома составляет 4,5 млн. п.о., в котором обнаружено 4608 потенциальных белок-кодирующих генов. Сравнительный анализ геномов показал, что ацидофильный сульфатредуцирующий штамм *Desulfosporosinus* sp. BG, растущий при pH 2,0 наиболее близкородственен штамму *Desulfosporosinus* sp. OT, выделенному ранее нашей группой, который тоже является ацидофильным сульфатредуцирующим организмом, однако оптимум pH для роста последнего значительно выше и составляет 5,59. На филогенетическом дереве оба этих штамма соседствуют с двумя валидно описанными ацидофильными СРБ *D. acidiphilus* и *D. acididurans*. Однако стоит отметить, что оптимумы pH для роста этих микроорганизмов составляют 5,2 и 5,5, а нижние границы pH для роста составляют 3,6 и 3,8, соответственно. Таким образом, нами получен драфт-геном нового ацидофильного сульфатредуктора.

Известно три уровня устойчивости к тяжелым металлам – это Р-тип АТФазы, RND-транспортеры, и белки, облегчающие диффузию катионов (CDF). Все эти молекулярные механизмы обнаружены в геноме *Desulfosporosinus* sp. BG. Были обнаружены гены, кодирующие АТФазы CopA (транспортеры меди/серебра), транскрипционные регуляторы CsoR, транскрипционный регулятор CopZ, семейство транспортных генов RND (resistance nodulation-cell division) и связанный с мембраной ген MFP. В том числе были обнаружены АТФазы Р-типа, транспортирующие ионы меди и серебра, а также тяжелые металлы Zn^{2+} , Cd^{2+} , и Pb^{2+} . Некоторые обнаруженные в геноме штамма BG белки имели значительные отличия от медных АТФаз, обнаруженных в доступных геномах *Desulfosporosinus* и были филогенетически близки только *Desulfosporosinus* sp. OT. Одна из АТФаз Р-типа (contig00039_9662_8148), которая возможно является транспортером Co, Cd, Hg, Pb и Zn, имела гомологичные АТФазы только в *Desulfosporosinus* sp. OT (сходство 97 %), *Desulfosporosinus* sp. I2 (92 %), *Desulfosporosinus acidiphilus* (86 %) и *Desulfosporosinus* sp. BRH_c37 (89 %). Полученные результаты описывают механизмы устойчивости ацидофильного штамма *Desulfosporosinus* sp. BG к ионам металлов.

Проведенные дополнительные лабораторные исследования для подтверждения полученных геномных данных, определяющих устойчивость к металлам и низким pH, позволили изучить влияние разных концентраций ионов металлов на продолжительность лаг-фазы и рост штамма BG при начальных значениях pH 2,0. Было показано, что продолжительность лаг-фазы (8-10 сут) и численность клеток ($54-56 \times 10^5$ кл/мл) оставалась на одном уровне при добавлении ионов меди в концентрациях от 500 мг/л до 3 г/л. При увеличении концентрации меди до 4 г/л продолжительность лаг-фазы увеличивалась как минимум вдвое, численность снижалась незначительно. Дальнейшее увеличение содержания меди в среде

снижало численность вдвое, а продолжительность лаг-фазы увеличивалась до 27 сут. Культивирование штамма с добавлением кадмия от 10 до 100 мг/л не влияло на численность ($44-46 \times 10^5$ кл/мл), однако продолжительность лаг-фазы увеличивалась с 15 сут до 25 сут. Последующее увеличение концентрации до 150 мг Cd/л способствовало замедлению роста и снижению численности. Ионы никеля и кобальта в концентрации от 20 до 100 мг/л не оказывали заметного воздействия на рост штамма. Устойчивость к высоким концентрациям ионов металлов, обусловленная присутствием в геноме АТФаз Р-типа, отличает штамм BG от других известных описанных в литературе видов *Desulfosporosinus*.

Проведенный эксперимент по культивированию бинарной культуры ацидофильных СРБ *Desulfosporosinus* sp. NP и *Desulfovibrio* sp. VK в биореакторе в присутствии ионов меди и кобальта и при pH 5,5 позволил получить биомассу спорообразующего штамма NP, чего не удавалось ранее при попытках культивировать отдельно представителей *Desulfosporosinus* в условиях биореактора. Полученные в ходе разных этапов культивирования консорциума осадки содержали сульфиды железа (пирит, FeS_2 ; пирротин, Fe_7S_8 ; марказит, FeS_2), железо-содержащие сульфиды меди (кубанит, CuFe_2S_3 ; халькопирит, CuFeS_2 ; орикит, $\text{CuFe}_2\text{S}_2 \times \text{H}_2\text{O}$) и чистые сульфиды меди (халькоцит, Cu_2S ; ярровит, Cu_9S_8 ; ковеллит, CuS) и кобальта (линнаит, Co_3S_4 ; джайпурит, CoS). Обнаруженное изменение минералогического состава осадков на разных этапах культивирования представляет интерес с точки зрения селективного получения сульфидов металлов. Так, были получены осадки, содержащие единственную кристаллическую фазу сульфида меди, – ярровит. Осадки, полученные в другой момент времени, содержали другие формы сульфида меди, а именно ковеллит и халькопирит. Получение кристаллических форм сульфидов меди, железа и кобальта в ходе культивирования в биореакторе ацидофильного консорциума штаммов СРБ позволит в дальнейшем разработать биотехнологический метод извлечения сульфидов металлов из отходов горнодобывающей промышленности.

В ходе проведения работ по гранту и в соответствии с планом-графиком исполнения обязательств при выполнении проекта проведены маркетинговые исследования и дополнительные патентные исследования, подготовлена заявка на получение патента «Способ получения сульфидов кобальта с использованием штамма бактерии *Desulfovibrio* sp. ED-20». Штамм *Desulfovibrio* sp. ED-20 был депонирован Всероссийской коллекцией микроорганизмов (ВКМ) Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (ИБФМ) под регистрационным номером ВКМ В-3048D.

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