

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 № 3 в период с 01.07.2015 по 31.12.2015 выполнялись следующие работы:

За счет бюджетных средств:

1. Проведение экспериментальных исследований объекта ПНИ, в том числе:
  - 1.1 Получение чистых культур новых штаммов ацидофильных сульфидогенных микроорганизмов, обнаруженных в метагеноме.
  - 1.2 Филогенетический анализ полученных чистых культур.
  - 1.3 Сопоставление полученных результатов по филогенетическому разнообразию культивируемых ацидофильных сульфидогенных микроорганизмов с данными метагеномного анализа.
  - 1.4 Проведение экспериментов по определению оптимальных условий культивирования полученных штаммов ацидофильных сульфидогенных микроорганизмов в лабораторных условиях, включая значения рН, температурные условия, ростовые субстраты, а также выявление условий для максимальной продукции биомассы и сероводорода.
  - 1.5 Определение предельных для роста концентраций ионов меди и других металлов.
2. Разработка лабораторной методики получения штаммов и/или консорциумов ацидофильных сульфидогенных микроорганизмов, устойчивых к низким значениям рН и высоким концентрациям ионов металлов.
3. Подведение итогов этапа ПНИ и разработка отчетной документации.

За счет внебюджетных средств:

1. Подготовка заявки на получение патента.
2. Культивирование штаммов ацидофильных сульфидогенных микроорганизмов в непрерывных условиях с использованием биореактора.
3. Подбор оптимальных условий для культивирования штаммов ацидофильных сульфидогенных микроорганизмов и образования нерастворимых осадков сульфидов при низких значениях рН с использованием биореактора при периодическом и проточном культивировании.

При этом были получены следующие результаты:

Проведены работы по культивированию консорциума ацидофильных сульфидогенных микроорганизмов в непрерывных условиях с использованием биореактора. Лабораторный биореактор с режимом перемешивания был использован для накопления и выделения ацидотолерантных/ацидофильных

сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) из отходов добычи металлов. До сих пор большинство известных ацидофильных СРБ относится к спорообразующим *Desulfosporosinus*. В этом исследовании акцент был сделан на дельтапротеобактериальных СРБ, которые характеризуются более высокими темпами роста. Лабораторный биореактор позволяет контролировать изменение параметров среды, которые могут приводить к смене доминирующих форм микроорганизмов, и может быть использован для накопления и выделения ацидофильных/ацидотолерантных дельтапротеобактериальных СРБ из отходов добычи сульфидных руд.

Культивирование в биореакторе, инокулированном накопительной культурой ШГ-14-5 из микробного мата с территории Акатуйского месторождения добычи металлов (Забайкалье), проводили при диапазоне рН от 3,7 до 7,3. При изменении условий культивирования в биореакторе происходило изменение морфотипов и филоотипов. Представители *Desulfovibrio*, обнаруженные методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ-анализа) фрагментов 16S рРНК, доминировали в консорциуме биореактора и были единственной группой с известной способностью к восстановлению сульфата. Обнаруженные филоотипы СРБ попадали в два отдельных клада внутри рода *Desulfovibrio*, а именно группы, близкие *D. aerotolerans*-*D. carbinophilus*-*D. magneticus* и *D. idahonensis*-*D. mexicanus*. Бактерии, близкие *D. mexicanus*, представляли наиболее постоянную составляющую сообщества и встречались почти во всех точках отбора проб. В биореакторе были выявлены и филоотипы, не относящиеся к СРБ, а именно *Cupriavidus basilensis* ( $\beta$ -*Proteobacteria*), *Sulfurospirillum multivorans* ( $\epsilon$ -*Proteobacteria*), *Terrabacter terrae* (*Actinobacteria*), *Acinetobacter calcoaceticus* ( $\gamma$ -*Proteobacteria*).

Осадки, образованные в ходе культивирования консорциума ШГ-14-5 в биореакторе, были отобраны после завершения процесса культивирования и изучены методами энерго-дисперсионного (ЭДС) и рентгено-фазового анализов. Основную весовую фазу полученного осадка составляли сера (S), железо (Fe), углерод (C) и кислород (O). Хотя ЭДС-анализ показал высокое содержание S и Fe, рентгено-фазовый анализ осадков не выявил наличия кристаллических фаз сульфидов железа. В осадке были обнаружены кристаллические фазы минерала группы силиатов рустумита и элементной серы. Вероятно, сульфиды железа присутствуют в осадке в аморфном состоянии, поэтому не обнаруживаются рентгено-фазовым анализом. Выявленное нами соотношение атомов Fe:S (1:2,0–4,5) может соответствовать двум типам сульфидов железа, встречающимся в природе ( $\text{FeS}$  и  $\text{Fe}_2\text{S}_3$ ). В некоторых точках измерения содержание серы в осадке значительно превышало содержание железа и соотношение Fe:S составляло 1:12,3–14,7. Здесь могло быть высокое содержание элементной серы. Эти данные соответствуют результатам рентгено-фазового анализа, так как элементная сера была доминирующей кристаллической фазой на дифрактограмме.

Помимо осадка, образованного *desulfovibrio*-содержащей культурой СРБ в биореакторе, изучали осадок, образовавшийся в растворе  $\text{CdCl}_2$  под действием  $\text{H}_2\text{S}$ , поступающего из биореактора. Дифракционный анализ показал присутствие чистых кристаллических фаз  $\text{CdS}$ . Проведенный анализ можно рассматривать как модельный эксперимент по осаждению ионов кадмия биогенным  $\text{H}_2\text{S}$ , полученным

при культивировании СРБ в биореакторе. Работы по изучению образования биогенных осадков сульфидов металлов новыми штаммами СРБ будут продолжены на следующем этапе выполнения ПНИ.

Из накопительной культуры ШГ-14-5, культивируемой в биореакторе, выделены две чистых культуры рода *Desulfovibrio* (штаммы VK, ED), устойчивые к низким значениям pH среды. Еще несколько ацидотолерантных штаммов *Desulfovibrio* (штаммы DV, ED-20, VK-9, VK-12) были выделены традиционным способом получения колоний на твердой среде с использованием проб отходов горнодобывающей промышленности. Также с помощью стандартных подходов к выделению чистых культур, включая выделение отдельных колоний из твердой среды, пересевы методом предельных разведений и прогревание жидкой культуры для удаления вегетативных клеток и получения спор, были получены две спорообразующие чистые культуры BG и NP, относящиеся к роду *Desulfosporosinus*. Источником выделения чистых культур послужили пробы кислых отходов добычи металлов месторождений «Бом-Горхон» и «Шерловая Гора» (Забайкалье).

Выделенные культивируемые формы образуют две филогенетические линии и принадлежат к представителям родов *Desulfovibrio* (класс *Deltaproteobacteria*) и *Desulfosporosinus* (отдел *Firmicutes*). Метагеномный анализ последовательностей генов 16S рРНК пробы ШГ14-3, полученной с территории хвостохранилища месторождения «Шерловая Гора», выявил присутствие СРБ группы *Deltaproteobacteria* в микробном сообществе кислых шахтных вод (3,2% от всех обнаруженных последовательностей сообщества). Ближайшими родственниками со степенью сходства 84 % оказались представители СРБ *Desulfomonile tiedjei* DSM 6799, *Desulfobacca acetoxidans* DSM 11109 и *Syntrophus aciditrophicus* SB. Более близких родственников культивируемых форм удалось обнаружить при анализе белков в метагеноме, родственных дельтапротеобактериальным последовательностям *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfomicrobium*, *Desulfotignum*, *Desulfobulbus* и таким последовательностям *Firmicutes* как *Desulfosporosinus youngiae* и *Desulfotomaculum alcoholivorax*. Также следует отметить, что среди последовательностей обнаружены родственные *Desulfovibrio* гены белков, участвующих в гомеостазе металлов. Этот факт может свидетельствовать о наличии устойчивости к ионам металлов у этой группы СРБ и объяснять их доминирование среди культивируемых форм из загрязненных металлами экосистем.

Выделенные штаммы росли при низких начальных значениях pH (1,5–3,8). Для полученных изолятов ацидофильных и ацидотолерантных СРБ определены диапазоны pH и установлены оптимальные значения pH для роста. Выделенные в чистую культуру из биореактора умеренно ацидофильный штамм *Desulfovibrio* sp. VK и ацидотолерантный *Desulfovibrio* sp. ED имели оптимум pH 5,7 и pH 6,6, соответственно. Штаммы VK, VK-9 и VK-12 имели 100%-ое сходство последовательностей 16S рРНК и одинаковые физиологические характеристики. То же самое касалось штаммов ED и ED-20. Выделенный из колонии *Desulfovibrio* sp. DV имел оптимум pH 5,5 и более широкий диапазон pH (3,8 – 9,47), по сравнению со штаммами VK и ED. Штамм VK показал наиболее ацидофильные свойства и рос при минимальных значениях pH 2,8. Среди представителей рода *Desulfovibrio* не известно валидно описанных ацидофильных форм. Большинство представителей этого рода имеют нижнюю границу pH для роста, не превышающую 5,8.

*Desulfovibrio bastinii*, описанный как умеренный ацидофил, имеет оптимум pH 5,8–6,2 и диапазон pH 5,2-7,4 (Magot et al., 2004). Единственной известной СРБ, растущей при низких начальных значениях pH, был штамм ТомС, выделенный из отходов добычи золота в Кузбассе (Karnachuk et al., 2015), который рос в диапазоне pH 2,0-7,5 с оптимумом 5,5.

Штаммы BG и NP, относящиеся к роду *Desulfosporosinus*, имели еще более низкие оптимальные значения pH. Активный рост штамма BG находился в пределах pH от 2,0 до 4,5 с оптимумом при pH 2,0. Минимальный pH, позволяющий рост культуры NP, составлял 1,28. Диапазон pH для роста составлял от 1,28 до 6,7 с наибольшей численностью клеток при pH 2,0-2,48 и 5,7-6,7. Исследования последних лет позволяют предполагать, что спорообразующие СРБ, принадлежащие к роду *Desulfosporosinus*, являются важными компонентами микробного сообщества, ответственного за диссимиляционную сульфатредукцию в экосистемах, связанных с добычей металлов и характеризующихся низкими значениями pH. Одной из первых культур СРБ, растущих при низких pH, был *Desulfosporosinus* sp. Lau III, выделенный из кислого озера, образовавшегося в результате поверхностной добычи угля в Лаузиц (Lusatia) в Германии (Kusel et al., 2009). Культура росла в узких пределах pH от 4,9 до 6,1 с оптимумом 5,5. Два валидно описанных ацидофила и несколько штаммов СРБ, имеющих оптимум pH ниже 5, все принадлежат к роду *Desulfosporosinus* и были выделены из экосистем, связанных с добычей металлов.

Для штаммов BG, NP, ED, DV и VK изучен рост в присутствии различных органических субстратов. В литературе закрепилось представление о том, что традиционный органический донор электронов для СРБ, лактат, не может быть использован для выделения ацидофильных культур, так как молочная кислота не диссоциирует при низких pH и предположительно является токсичной для бактерий. Несмотря на этот факт, все выделенные штаммы, устойчивые к низким значениям pH, росли на среде с добавлением лактата. Среди других известных ацидофильных СРБ слабый рост на среде с лактатом показан для *Desulfosporosinus acidiphilus*, *D. acididurans* и *D. sp. Lau III*. Это доказывает, что присутствие лактата не является препятствием для роста некоторых СРБ в условиях кислых pH. Возможно, ацидофильные и ацидотолерантные представители *Desulfosporosinus* и *Desulfovibrio* обладают механизмом, позволяющим ограничивать проникновение недиссоциированных кислот внутрь клетки.

Изучена устойчивость чистых культур СРБ к таким металлам, как медь, никель, кобальт, кадмий. Штамм *Desulfosporosinus* sp. BG показал наибольшую устойчивость к ионам меди (до 5 г/л) и кадмия (до 200 мг/л). Штамм *Desulfovibrio* sp. VK оказался более устойчив к ионам никеля (до 250 мг/л), штаммы DV и ED - к ионам кобальта (до 1200 мг/л и 2000 мг/л, соответственно). Устойчивость к металлам является важной с точки зрения возможного использования ацидофильных штаммов для биоремедиации. Выделенные новые штаммы СРБ обладали способностью расти в присутствии ионов меди, никеля, кобальта и кадмия в концентрациях, превышающих описанные в литературе значения для других представителей этих родов.

Таким образом, все выделенные нами штаммы спорообразующих и дельтапротеобактериальных СРБ обладали ацидофильными или ацидотолерантными свойствами и проявляли устойчивость к повышенным

концентрациям тяжелых металлов, что делает их перспективными для использования в технологиях биоремедиации.

В ходе проведения работ по гранту и в соответствии с планом-графиком исполнения обязательств при выполнении проекта подготовлена заявка на получение патента № 2015151080 от 30.11.2015 «Штамм бактерии *Desulfovibrio* sp. VK-9 для очистки кислых сточных вод от ионов тяжелых металлов» (Авторы: О.В. Карначук, А.Л. Герасимчук, Ю.А. Франк, И.В. Луцаева). Штамм *Desulfovibrio* sp. VK-9 был депонирован Всероссийской коллекцией микроорганизмов (ВКМ) Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН (ИБФМ) под регистрационным номером ВКМ В-3000D.

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.