

На правах рукописи

Фролов Евгений Николаевич

**СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИЕ ПРОКАРИОТЫ КИСЛЫХ
ТЕРМАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ ПОЛУОСТРОВА КАМЧАТКА**

Специальность 03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва - 2017

Работа выполнена в лаборатории гипертермофильных микробных сообществ Института микробиологии им. С.Н. Виноградского (ИНМИ РАН) Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Научный руководитель: **Черных Николай Алексеевич,**
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института микробиологии имени С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Официальные оппоненты: **Вайнштейн Михаил Борисович,**
доктор биологических наук, профессор Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина Российской академии наук», зав. лабораторией физиологии микроорганизмов
Карначук Ольга Викторовна,
доктор биологических наук, профессор Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», зав. кафедрой физиологии растений и биотехнологии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Биологический факультет

Защита состоится 21 июня 2017 г. в 14.00 ч на заседании диссертационного совета Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского по адресу: 117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНМИ РАН (117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru/>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2017 года

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Хижняк Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Диссимиляционная сульфатредукция - важнейший природный процесс, который широко распространён в анаэробных местообитаниях и осуществляется только прокариотами (Muzyer & Stams, 2008; Rabus *et al.*, 2015). В течение длительного времени считалось, что сульфатредуцирующие прокариоты (СРП) предпочитают местообитания с нейтральным рН, а вопрос о протекании данного процесса в кислых условиях оставался дискуссионным (Widdel, 1988; Hao *et al.*, 1996). Однако, со временем были получены доказательства осуществления процесса сульфатредукции в местообитаниях с низким значением рН (Karnachuk *et al.*, 2005; Koschorreck, 2008; Karnachuk *et al.*, 2009), а также были выделены и охарактеризованы первые ацидофильные сульфатредуцирующие бактерии рода *Desulfosporosinus*. Первым описанным ацидофильным сульфатредуцирующим микроорганизмом был *D. acidiphillus*, который рос в интервале рН 3.6–6.5 с оптимумом 5.2 (Alazard *et al.* 2010). Несмотря на это, сведения по сульфатредукции в местообитаниях с термоацидофильными условиями остаются весьма ограниченными. В литературе приводятся данные по активности СРП только для нескольких кислых термальных источников национального парка Йеллоустон (Fishbain *et al.*, 2003; Roychoudhury, 2004), однако, агенты диссимиляционной сульфатредукции в данных источниках не выявлены. Единственным известным термоацидофильным сульфатредуцирующим микроорганизмом на данный момент является *Thermodesulfobium narugense*, выделенный из термального источника в Японии и растущий в интервале рН 4.0–6.5 с оптимумом 5.5–6.0 и в интервале температур 37–65°C с оптимумом 55°C (Mori *et al.*, 2003).

В литературе также имеются предположения, что такие термоацидофильные организмы как '*Candidatus V. moutnovskia 768-28*' (Gumerov *et al.*, 2011), *Caldivirga maquilgensis* (Itoh *et al.*, 1999), *Thermoproteus tenax* (Siebers *et al.*, 2011), *Vulcanisaeta souniana* (Itoh *et al.*, 2002) и *Vulcanisaeta distributa* (Itoh *et al.*, 2002), относящиеся к типу *Crenarchaeota* и имеющие в геномах гены диссимиляционной сульфитредуктазы (*dsrAB*), также могут восстанавливать сульфат до сульфида. Однако экспериментальных подтверждений этого до настоящего времени не представлено. Интересно, что представителями архейной сульфатредукции считаются организмы рода *Archaeoglobus*, но филогенетический анализ генов, ответственных за этот процесс, показал, что данные гены имеют бактериальное происхождение (Klein *et al.*, 2001). Таким образом, вопрос о наличии архейной сульфатредукции, от ответа на который зависит датировка эволюционного возникновения процесса, остаётся открытым.

Цель и задачи исследования. Цель работы - исследование процесса диссимиляционной сульфатредукции в кислых термальных источниках с последующим выделением микроорганизмов, ответственных за данный процесс; их характеристика и выявление особенностей генетических детерминант сульфатредукции в их геномах.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1) Выявление кислых термальных источников с высокой интенсивностью сульфатредукции и определение состава микробных сообществ в этих источниках.

2) Получение накопительных культур СРП, а также выделение и описание новых термоацидофильных микроорганизмов, осуществляющих процесс диссимиляционной сульфатредукции.

3) Изучение распространения необходимого набора генов диссимиляционной сульфатредукции в геномах представителей домена *Archaea* и проведение филогенетического анализа ключевых генов сульфатредукции.

4) Получение экспериментальных доказательств осуществления процесса архейной диссимиляционной сульфатредукции у '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28'.

Научная новизна и теоретическая значимость работы. Осуществлено комплексное исследование процесса диссимиляционной сульфатредукции в кислых геотермальных местообитаниях со значениями pH от 2.5 до 6.1. С помощью радиоизотопных методов показана высокая интенсивность сульфатредукции в ряде термальных источниках с низким значением pH. С использованием молекулярно-биологических методов определен состав микробных сообществ в источниках с высокой активностью СРП. Впервые показано, что в источниках с экстремально термоацидофильными условиями за процесс сульфатредукции отвечают представители филума *Crenarchaeota*, в то время как в источниках с умеренно термоацидофильными условиями данный процесс осуществляют бактерии.

Выделены и охарактеризованы новые термоацидофильные СРП. Описан новый вид *Thermodesulfobium acidiphilum* sp. nov., растущий в интервале pH 3.7–6.5 с оптимумом 4.8–5.0 и в интервале температур 37–65°C с оптимумом 54°C, который вместе с *Th. narugense* (Mori *et al.*, 2003) образует глубокую филогенетическую ветвь на эволюционном древе бактерий. Кроме того, охарактеризован новый род '*Desulfothermobacter*', включающий один новый вид – '*Desulfothermobacter acidiphilus*', растущий в интервале pH 2.9–6.5 с оптимумом 4.5 и в интервале температур 42–70°C с оптимумом 54°C.

Для коллекционных штаммов термоацидофильных архей – *V. souniana*, *V. distribute*, *T. tenax* и *C. maquilingsis*, а также для бинарной культуры, состоящей из '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' и *T. uzoensis* штамм 768-20, исследована способность к диссимиляционной сульфатредукции. Показано, что только бинарная культура с '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' способна к сульфатному дыханию. Таким образом, впервые получены экспериментальные доказательства процесса диссимиляционной сульфатредукции у представителей домена *Archaea*. На основе данных геномного и протеомного анализов предложена общая схема процесса сульфатного дыхания у '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28'. Филогенетический анализ генов *dsrAB* из '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' показал их архейное происхождение.

Практическая значимость работы. Микроорганизмы, обитающие в экстремальных условиях, могут являться потенциальным источником новых ферментов, ценных для использования в производствах, требующих повышенных температур и/или низких значений pH среды. Кроме того, новые знания об ацидофильных СРП могут быть полезны в работах, связанных с биоремедиацией таких местообитаний, как карьерные озёра, хвостохранилища рудников, дренажи кислых сточных вод.

Личный вклад соискателя. Соискатель лично принимал участие во всех этапах работы: разработке и апробации экспериментальных методов, проведении экспериментов, обработке и обобщении полученных результатов, написании статей и тезисов конференций.

Основные положения и результаты, выносимые на защиту.

1) Показана активность СРП в ряде кислых термальных источников, а также установлено, что в источниках с экстремально термоацидофильными условиями за процесс сульфатредукции отвечают археи, а в источниках с умеренно термоацидофильными условиями данный процесс осуществляют бактерии.

2) Получены и охарактеризованы чистые культуры новых термоацидофильных СРП - *Thermodesulfobium acidiphilum* sp. nov. и '*Desulfothermobacter acidiphilus*' gen. nov., sp. nov.

3) Анализ геномов показал, что среди представителей домена *Archaea* только '*Candidatus* V. moutnovskia 768-28' обладает необходимым набором генов диссимиляционной сульфатредукции. Филогенетический анализ ключевых генов сульфатредукции из '*Candidatus* V. moutnovskia 768-28' показал их архейное происхождение.

4) С помощью культурального, радиоизотопного и протеомного методов исследования получены экспериментальные доказательства осуществления процесса диссимиляционной сульфатредукции у '*Candidatus* V. moutnovskia 768-28', в то время как для *T. tenax*, *C. maquilingsis*, *V. distributa* и *V. souniana* способность к сульфатредукции не обнаружена.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены на международной конференции “The 10th International Congress on Extremophiles” (Санкт-Петербург, Россия, 2014), Всероссийском симпозиуме с международным участием “Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов” (Москва, Россия, 2014), международной конференции “The 13th International Conference on Thermophiles” (Сантьяго, Чили, 2015), международной конференции “Gordon Research Conference on Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism” (Уотервиль Вэллей, США, 2016).

Публикации. Материалы диссертации содержатся в 7 печатных работах: 3 экспериментальных статьях и 4 тезисах.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 142 страницах машинописного текста и включает 25 рисунков и 6 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, содержащей две главы (Объекты и методы исследования и Результаты), заключения, выводов и списка литературы, который содержит 237 наименований.

Место проведения работы. Работа выполнялась в Лаборатории гипертермофильных микробных сообществ Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН. Секвенирование ПЦР продуктов проводилось к.т.н. Колгановой Т.В. на базе Центра биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН. Секвенирование генома *Th. acidiphilum* выполнялось в

Балтийском федеральном университете под руководством к.б.н. Тощакова С.В. Исследование протеома было выполнено под руководством проф. Голышина П.Н. на базе School of Biological Sciences, Bangor University (Великобритания).

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю к.б.н. Черных Н.А за предложенную тему, постоянное внимание и большую помощь в работе и обсуждении результатов. Особую благодарность автор приносит заведующей лабораторией гипертермофильных микробных сообществ д.б.н. Бонч-Осмоловской Е.А. и сотрудникам данной лаборатории к.б.н. Лебединскому А.В., к.б.н. Кубланову И.В., к.б.н. Меркелю А.Ю., к.б.н. Прокофьевой М.И. и д.б.н. Мирошниченко М.Л. Автор искренне благодарит всех сотрудников и аспирантов лаборатории гипертермофильных микробных сообществ за содействие и поддержку, за доброжелательную и творческую атмосферу в коллективе. Автор выражает признательность всем коллегам, принимавшим участие в различных этапах работы: д.б.н. Пименову Н.В., Кострикиной Н.А., д.б.н. Сорокину Д.Ю., к.х.н. Новикову А.А., проф. Голышину П.Н., к.б.н. Тощакосу С.В.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объекты исследования. Для проведения исследования из коллекции DSMZ были получены следующие коллекционные культуры: *T. tenax* DSM 2078, *V. souniana* DSM 14430, *V. distributa* DSM 14429 и *C. maquilingsis* DSM 13496. У сотрудницы Лаборатории гипертермофильных микробных сообществ ФИЦ Биотехнологии РАН Прокофьевой М.И. была получена бинарная культура, состоящая из двух компонентов – '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' и *T. uzoniensis* 768-20. Кроме того, объектами исследования выступали чистые и накопительные культуры термоацидофильных сульфатредуцирующих прокариот, выделенные из кислых термальных источников в ходе выполнения работы, а также сами источники.

Отбор проб. В работе были использованы пробы осадков и воды, отобранные в ходе экспедиций 2014 и 2015 гг. из наземных термальных источников кальдеры вулкана Узон и подножия вулкана Мутновский.

Определение активности СРП с помощью радиоизотопных методов. Скорость процесса сульфатредукции определяли радиоизотопным методом с использованием ^{35}S -сульфата. Для определения интенсивности автотрофной фиксации CO_2 применяли ^{14}C -бикарбонат. Радиоизотопные опыты проводили в лаборатории через 10-14 суток после отбора проб. Инкубацию проводили в термостатах при температурах, соответствующих температурам в источниках, в течение 3 суток. После завершения инкубации пробы фиксировали 1 мл 2М раствора NaOH. В каждой серии измерений был абиотический контроль, который представлял собой пробу с добавлением 1 мл 2М раствора NaOH перед началом инкубации. Дальнейшую обработку проб осуществляли по описанной ранее методике (Pimenov, Bonch-Osmolovskaya, 2006).

Культивирование микроорганизмов. Для получения и культивирования накопительных и чистых культур термоацидофильных СРП использовали модифицированную среду Пфеннига (Pfennig, 1965). Растворы микроэлементов (Кевбрин, Заварзин, 1992) и витаминов (Wolin *et al.*, 1963) добавляли по 1 мл на 1 л среды. Для культивирования накопительных и чистых культур были использованы различные органические и неорганические субстраты роста.

Микроскопия. Рост клеток и клеточная морфология были исследованы с использованием светового микроскопа Olympus CX-41 с фазово-контрастным устройством. Ультратонкое строение клеток исследовали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100С (Jeol, Tokyo, Japan). Препараты целых клеток окрашивали фосфовольфрамовой кислотой с рН 3.5. Ультратонкие срезы получали на микротоме LKB-3R. Далее проводили окрашивание 3% водным раствором уранилацетата с использованием стандартных методов фиксации клеток и окраски срезов. Препараты целых клеток окрашивали фосфовольфрамовой кислотой с рН 3.5.

Аналитические методы. Образование H_2S определяли колориметрическим методом с N,N-диметилпарафенилендиамином в модификации Трюпера и Шлегеля (Trüper, Schlegel, 1964). Концентрацию сульфат-анионов измеряли на ионном хроматографе «Стайер» (Россия). Концентрацию водорода определяли на хроматографе «Хроматэк Кристалл 5000.1» с использованием колонки Hayesep N 80/100. Элементы карбонатной системы (гидрокарбонат ион и свободную углекислоту) определяли методом титриметрии.

Молекулярные методы. Выделение ДНК из отобранных проб, амплификацию генов 16S рРНК с помощью полимеразной цепной реакции, а также ДГГЕ-анализ проводили согласно ранее описанным методикам (Chernyh *et al.*, 2015). Секвенирование ПЦР продуктов проводилось к.т.н. Колгановой Т.В. на базе Центра биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН. ПЦР продукты секвенировали с использованием набора Big Dye Terminator kit v.3.1 и автоматического секвенатора ABI 3730 (“Applied Biosystems”, США) в соответствии с инструкцией изготовителя. Филогенетические деревья, основанные на сравнении последовательностей гена 16S рРНК, были построены в программе MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Анализ осуществляли с использованием метода Maximum Likelihood, базирующегося на модели Tamura-Nei (Tamura, Nei, 1993). С целью получения библиотек фрагментов генов 16S рРНК мы применяли метод ПЦР, где использовали модифицированные универсальные праймеры на четвертый варибельный участок гена 16S рРНК бактерий и архей: UNIV 515F/806R (Caporaso *et al.*, 2012). Состав микробного сообщества определяли секвенированием фрагментов генов 16S рРНК с использованием системы MiSeq (Illumina, США). Для проведения процедуры секвенирования использовали наборы реагентов, способных обеспечить длину прочтения в 300 нуклеотидов с каждого конца ампликона. Полногеномное секвенирование *Th. acidiphilum* 3127-1 проводилось под руководством к.б.н. Тощакова С.В. на базе Балтийского федерального университета имени И. Канта с использованием платформы Illumina Miseq согласно протоколу производителя. Для сборки генома в одну хромосому использовали Spades 3.6.0 (Bankevich *et al.*, 2012).

Исследование протеома у бинарной культуры, состоящей из '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' и *T. uzoniensis* 768-20. Данная работа была выполнена при участии проф. Голышина П.Н. на базе School of Biological Sciences, Bangor University (Великобритания). Каждый образец подвергали 1D-nano LC ESI-MS MS анализу с использованием наножидкостных хроматографических систем (Eksigent Technologies nanoLC Ultra 1D plus, AB SCIEX, Foster City, CA), сопряжённых с высокоскоростным масс-спектрометром Triple TOF 5600 (AB SCIEX, Foster City, CA) с Nanospray III source. Анализ данных, полученных при MS и MS/MS, проводили с помощью Analyst® TF 1.7 Software (SCIEX).

Статистические анализы выполнены при помощи пакета MS Excel 2003.

Результаты исследования и их обсуждение

Отбор проб. Отбор проб осуществляли у подножия вулкана Мутновский на двух площадках с геотермальной активностью. На так называемой Активной площадке наибольший интерес вызвала система небольших источников (каждый в среднем 10-15 см в диаметре), расположенных на крутом глинистом склоне с очень бедной растительностью. Температура в источниках составляла в среднем 90-92°C, значение рН варьировало в интервале 3.4-3.7. У большинства источников по краям находился железистый осадок. Для исследования был выбран источник, получивший название Орешек, из которого отбор проб производили в 2014 и 2015 годах. На второй площадке - Группа источников Дачные, пробы были отобраны из источников Подкаменный, 3105М и 3106М. Общей чертой данных источников было наличие густого травяного покрова по их краям, что, в свою очередь, обуславливало наличие большого количества растительных остатков и, предположительно, обилие органического вещества в самих источниках.

В кальдере вулкана Узон были отобраны пробы осадков и воды из источника Солнечный и с Нефтяной площадки на Центральном термальном поле, из источников 3420 и 3423 на Западном поле и из источников 3412 и 3405U на Оранжевом поле. Отобранные нами пробы из источников имели диапазон температур от 52°C до 92°C; минимальное значение рН составляло 2.5, максимальное – 6.1. Концентрация сульфата варьировала от 15 до 951.2 мг/л. Основные параметры источников представлены в таблице 1.

Активность СРП в источниках. С помощью радиоизотопного метода была определена потенциальная скорость сульфатредукции (ССР) в пробах. Результаты измерений представлены в таблице 1. Значения скоростей, достоверно указывавших на процесс сульфатредукции, были получены для проб из источников Орешек, Подкаменный, Солнечный и почвенной пробы с Нефтяной площадки. Исследовано влияние ряда субстратов (дрожжевой экстракт, лактат, ацетат, этанол, метанол и H₂) на скорость сульфатредукции (рис. 1). Добавление вышеперечисленных субстратов к пробе из источника Орешек приводило к ингибированию активности СРП. Увеличение скорости сульфатредукции в пробе из источника Подкаменный происходило при внесении любого из выбранных субстратов за исключением метанола, который оказывал ингибирующее действие. На активность СРП в почвенной пробе с Нефтяной площадки наибольшее стимулирующее действие

оказало добавление водорода и дрожжевого экстракта. Незначительное увеличение скорости сульфатредукции происходило при добавлении этанола, добавление лактата и ацетата не оказало влияния на интенсивность процесса, метанол оказывал ингибирующее влияние. Для пробы из источника Солнечный было показано стимулирующее действие всех субстратов. Аналогичный эксперимент был поставлен и для проб, в которых изначально сульфатредукция не была обнаружена. Для пробы 3423, отобранной на Западном поле кальдеры вулкана Узон, добавление лактата позволило выявить активность СРП, которая составила 3.1 нмоль S²⁻/(см³·сут).

Таким образом, активность СРП была показана для местообитаний как с экстремальными (Орешек и 3423), так и с умеренными (Подкаменный, Нефтяная площадка, Солнечный) термоацидофильными условиями.

Таблица 1. Основные характеристики источников и результаты измерения потенциальной скорости сульфатредукции в них

Название источника	Координаты источника	Год отбора	Тем-ра, °С	pH	[SO ₄ ²⁻], мг/л	ССР, нмоль S ²⁻ /(см ³ ·сут)
Орешек (№3102М / 3402)	52° 31,818' N 158° 11,499' E 823 м	2014	91	3.5	538	1.094
		2015	92	3.43	309.3	5.49
№ 3105М (Дачные)	52° 32,150' N 158° 11,653' E 794 м	2014	84	4.1	165	0.083
№ 3106М (Дачные)	52° 32,454' N 158° 11,083' E 796 м	2014	91	3.2	15	0.054
Подкаменный (№ 3408)	52° 32.087' N 158° 11.851' E 794 м	2015	60	5.57	101.3	2.231
№ 3105U (Оранжевое поле)	54° 30,384' N 160° 00,087' E 661 м	2014	65	4.0	433	0.147
№ 3112U / 3412 (Оранжевое поле)	54° 30,413' N 160° 00,043' E 663 м	2014	83	3.0	635	0.110
		2015	82	2.5	951.2	0.015
Нефтяная площадка (№3427)	54° 30,023' N 160° 00,088' E 654 м	2015	60	4.2	220	12.900
№3420 (Западное поле)	54° 30.035' N 159° 56.836' E 709 м	2015	70	3	701	0.027
№3423 (Западное поле)	54° 30.009' N 159° 56.983' E 709 м	2015	72	5	262	0.027
Солнечный (№3424)	54° 29.941' N 159° 59.530' E 657м	2015	52	6.1	58	2.421

Полужирным шрифтом выделены источники, для которых была показана активность СРП.

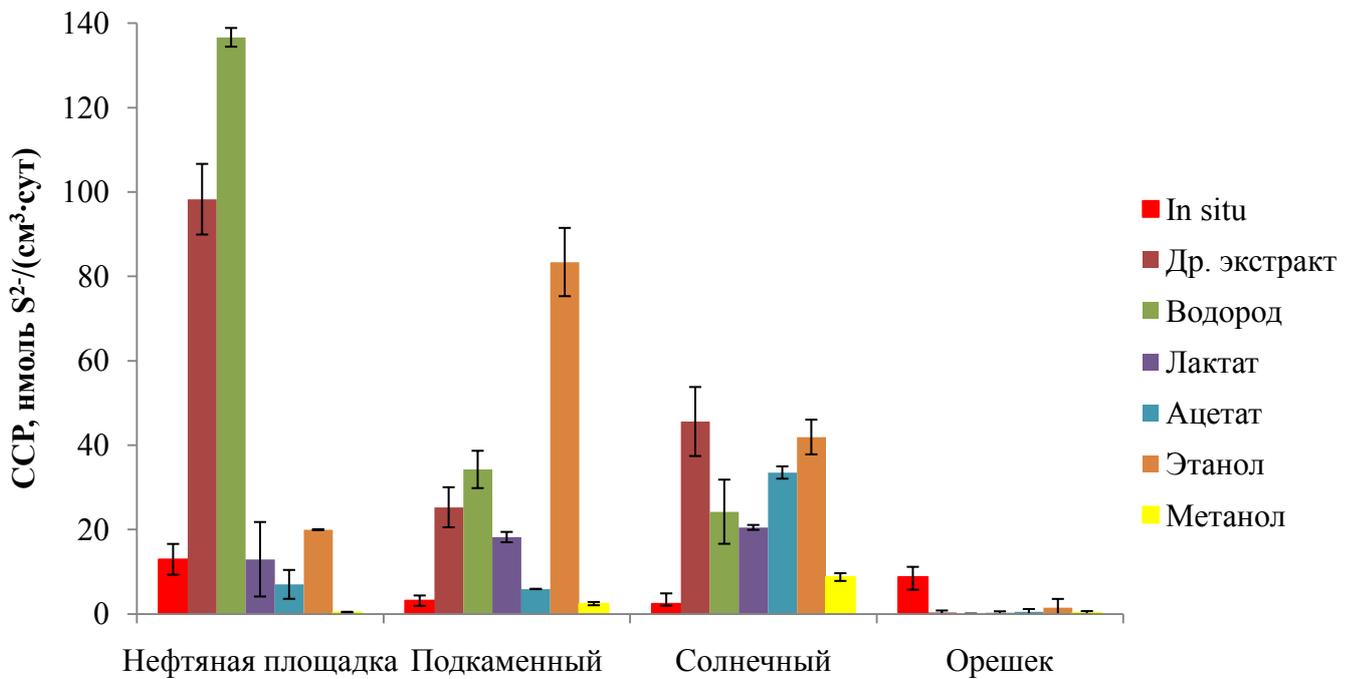


Рис. 1. Влияние разных субстратов на скорость сульфатредукции.

Выделение и описание новой термоацидофильной бактерии *Thermodesulfobium acidiphilum* sp. nov. Из пробы Нефтяной площадки была получена накопительная культура, осуществляющая термоацидофильную сульфатредукцию с использованием водорода. DGGE-анализ фрагментов генов 16S рРНК этой накопительной культуры показал, что она состоит из двух компонентов – бактерии, близкой к *Th. narugense*, и бактерии, близкой к *Desulfurella acetivorans*. Рост бинарной культуры облигатно зависел от анаэробных условий и происходил исключительно в восстановленной сульфидом среде. При пересеве на агаризованную среду с сульфатом в присутствии водорода, после 14 суток инкубации при 60°C и pH 4.8 были получены одиночные колонии краснокоричневого цвета, диаметром 2-3 мм. В результате пересева на жидкую среду и дополнительной очистке десятикратными разведениями был получен штамм 3127-1^T (=DSM 102892^T =VKM В-3043^T).

Клетки штамма 3127-1^T имели палочковидную форму. Длина клетки – 1–5 мкм, диаметр – 0.5 мкм. В начале экспоненциальной фазы роста клетки были подвижны за счёт одного субполярно расположенного жгутика, но в дальнейшем клетки теряли подвижность (рис. 2А). Ультратонкие срезы клеток штамма 3127-1^T показали наличие грамтрицательной клеточной стенки с внешней мембраной (рис. 2Б). Внутриклеточных включений и мембран обнаружено не было.

Штамм 3127-1^T являлся облигатным анаэробом, рост которого был показан исключительно на восстановленной сульфидом среде, умеренным термофилом с ростом в диапазоне 37–65 °С и оптимумом 54 °С, умеренным ацидофилом с ростом в интервале pH 3.7–6.5 и оптимумом при 4.8–5.0. Штамм оптимально рос в отсутствии NaCl, но был способен к росту в присутствии 1% NaCl. Штамм 3127-1^T культивировали в оптимальных условиях при температуре 54°C и pH 4.8. Минимальное время удвоения при оптимальных условиях составляло 16 часов, при этом максимальная численность клеток достигалась через 120 часов.

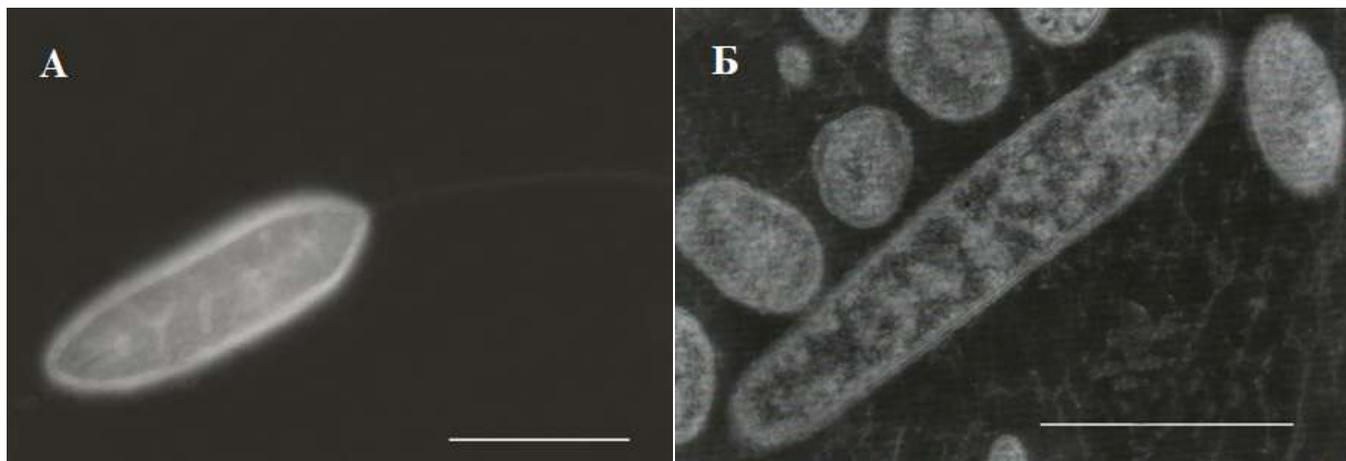


Рис. 2. Морфология и ультраструктура клеток *Thermodesulfobium acidiphilum* 3127-1^T: (А) электронная микроскопия, препараты целых клеток (окраска фосфовольфрамовой кислотой), масштаб – 1 мкм; (Б) электронная микроскопия, ультратонкие срезы (окраска уранилацетатом), масштаб – 1 мкм.

Штамм 3127-1^T оптимально рос в хемолитоавтотрофных условиях с H₂ в качестве донора электронов, HCO₃⁻/CO₂ в качестве источника углерода и сульфатом в качестве акцептора электронов (рис. 3). Сульфид был единственным конечным продуктом метаболизма, концентрация которого достигала 10 мМ. В присутствии сульфата изолят был способен к росту на формиате (20мМ) в качестве источника углерода и донора электронов, однако скорость роста и урожай клеток существенно снижались. Штамм 3127-1^T не использовал дрожжевой экстракт, пептон (1 г/л каждого), глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу (5 мМ каждого), ацетат, лактат, пируват, малат, пропионат, бутират, фумарат, сукцинат, цитрат, этанол, пропанол, метанол (20 мМ каждого) или СО (N₂/СО = 1:1, 4:1 или 20:1). В присутствии H₂/СО₂ (80:20) в газовой фазе штамм 3127-1^T был способен к дыханию на тиосульфате (10 мМ), но не использовал нитрат (10 мМ), нитрит (5мМ), элементную серу (10 г/л), Fe (III) цитрат (10 мМ), фумарат (10 мМ) и O₂ в качестве акцепторов электронов.

Штамм 3127-1^T был чувствителен к ампициллину, новобиоцину, хлорамфениколу, канамицину, стрептомицину, оксипиллину, неомицину, полимиксину и бензилпенициллину, но устойчив к действию ванкомицина (все антибиотики тестировали в концентрации 50 мкг/мл).

Анализ состава жирных кислот клетки показал, что С16:0 является мажорным компонентом, на долю которого приходится 42.4% от общего количества жирных кислот. Кроме того были детектированы следующие жирные кислоты: С18:0 (18.8%), С19:0сус (13.6%), С21:0сус (4.9%), С20:0 (4.9%), С12:0 (4.7%), С18:1ω9 (4.2%), С14:0 (3.4%), С22:0 (2.1%), С10:0 (0.5%), С15:0 (0.5%). Полярные липиды мембран были представлены неидентифицированными фосфогликолипидами. Доминирующим хиноном был МК-7, в то время как МК-8 и МК-9 являлись минорными компонентами.

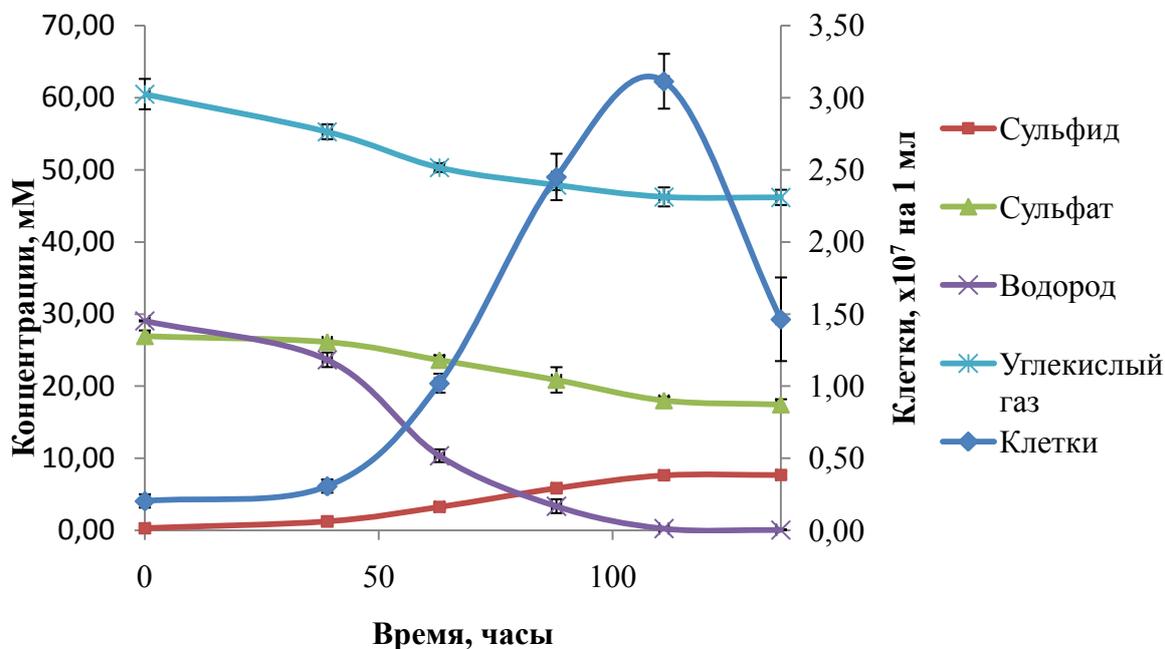


Рис. 3. Рост штамма 3127-1^T в присутствии водорода и сульфата.

С использованием платформы Illumina Miseq была определена последовательность генома штамма 3127-1^T, которая была собрана в единственную хромосому с использованием Spades 3.6.0 (Bankevich *et al.*, 2012). Содержание G+C-пар *in silico* составило 33.7 мол%. В геноме было обнаружено две молекулы 16S рРНК, различающихся одной нуклеотидной заменой. BLASTn против генов 16S рРНК валидно опубликованных микроорганизмов с использованием сервера EzTaxon-e (Kim *et al.*, 2012) показал, что оба гена 16S рРНК из штамма 3127-1^T на 99.5% идентичны двум генам 16S рРНК из *Th. narugense* Na82^T. Следующие наиболее близкие последовательности гена 16S рРНК имели менее 83% сходства и принадлежали представителям филума *Firmicutes*. Средняя идентичность нуклеотидов (ANI) геномов штамма 3127-1^T и *Th. narugense* Na82^T была определена с использованием ANI-калькулятора (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>) и составила 86%, что значительно ниже 95% межвидового барьера (Goris *et al.*, 2007, Richter and Rossello-Mora, 2009).

Значение ДНК-ДНК гибридизации *in silico* между геномами штамма 3127-1^T и *Th. narugense* Na82^T было предсказано GGDC 2.1 BLAST+ (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013; <http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>) с использованием рекомендованной формулы 2 и составило 32.5% +/- 2.5. Таким образом, штамм 3127-1^T представляет новый (второй) вид рода *Thermodesulfobium*, для которого нами предложено название *Th. acidiphilum*.

Положение представителей рода *Thermodesulfobium* на филогенетическом древе, построенном на основании анализа последовательностей 31 рибосомного белка, свидетельствует о возможности реклассификации семейства *Thermodesulfobiaceae* в таксон более высокого порядка (рис. 4).

Анализ генома штамма 3127-1^T показал присутствие всех необходимых генов сульфатредукции и генов одного возможного пути автотрофной ассимиляции CO₂ - цикла Кальвина. На данный момент, штамм 3127-1^T является единственным сульфатредуцирующим микроорганизмом, фиксирующим CO₂ через цикл Кальвина.

Выделение и описание новой термоацидофильной бактерии *'Desulfothermobacter acidiphilus'* gen. nov. sp. nov. Из источника Подкаменный была получена устойчивая микробная ассоциация, восстанавливающая сульфат в хемолитоавтотрофных условиях в присутствии водорода в качестве донора электронов. Рост накопительной культуры облигатно зависел от анаэробных условий и происходил исключительно в восстановленной сульфидом среде. Чистая культура штамма 3408-1^T была получена с помощью последовательных посевов разведениями.

Клетки штамма 3408-1^T имели палочковидную форму. Длина клетки – 3–6 мкм, диаметр – 0.6 мкм. Ультратонкие срезы клеток штамма 3408-1^T показали наличие грамположительной клеточной стенки. Внутриклеточных включений и внутренних мембран обнаружено не было. Новый штамм был способен образовывать круглые терминальные эндоспores после 7 суток инкубации, однако, число спорообразующих клеток было невелико и обычно не превышало 2–3 %.

Штамм 3408-1^T являлся анаэробом, для которого также была показана способность к росту в микроаэробных условиях (до 2% кислорода в газовой фазе) после продолжительной лаг-фазы. Штамм 3408-1^T являлся умеренным термофилом, который рос в диапазоне 42–70°C с оптимумом при 55°C, и умеренным ацидофилом с ростом в интервале pH 2.9–6.5 с оптимумом при 4.5. Данный микроорганизм не нуждался в присутствии NaCl в среде, но был способен к росту при 2% NaCl. Минимальное время удвоения в оптимальных условиях составляло 14 часов, при этом максимальная численность достигалась через 96 часов.

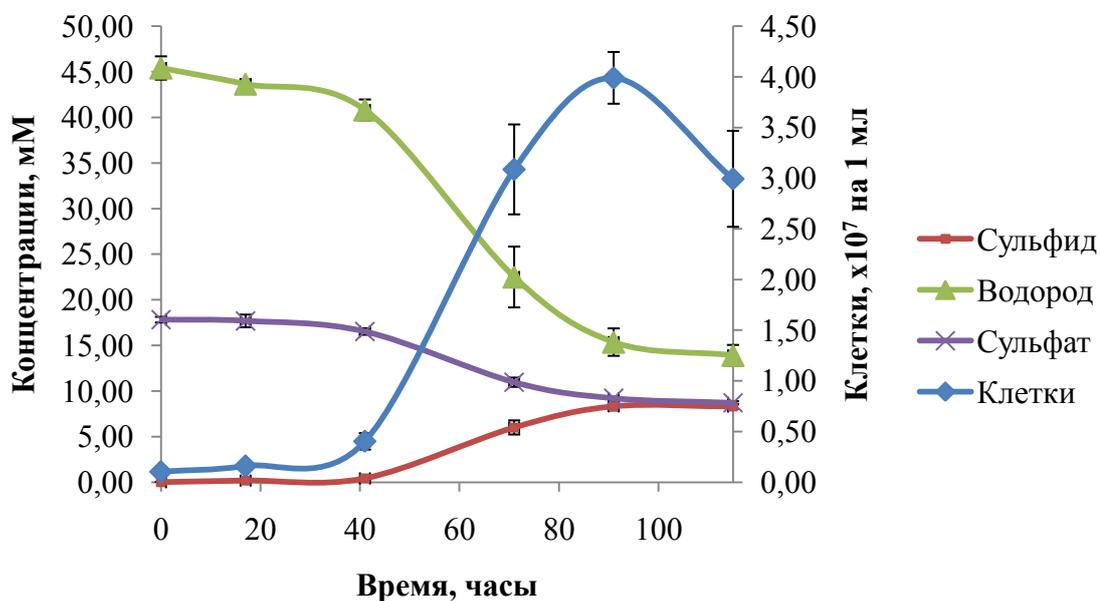


Рис. 5. Рост штамма 3408-1^T в присутствии водорода и сульфата.

Штамм 3408-1^T рос в хемолитоавтотрофных условиях с H₂ в качестве донора электронов, HCO₃⁻/CO₂ в качестве источника углерода и сульфатом в качестве акцептора электронов. Сульфид был единственным конечным продуктом в процессе сульфатного дыхания (рис. 5). В качестве альтернативных субстратов для сульфатредукции штамм 3408-1^T использует дрожжевой экстракт (1 г/л), мальтозу, сахарозу и глюкозу (каждой по 10 мМ). Штамм 3408-1^T был способен к сбраживанию дрожжевого экстракта, мальтозы, сахарозы и глюкозы. В присутствии H₂/CO₂ (80:20) в газовой фазе штамм 3408-1^T был способен к дыханию на

тиосульфате (10 мМ), но не использовал нитрат (10 мМ), нитрит (5мМ), арсенат (10 мМ), селенат (10 мМ), элементарную серу (10 г/л), Fe (III) цитрат (10 мМ), фумарат (10 мМ) и O₂ в качестве акцепторов электронов.

Штамм 3408-1^T был чувствителен к ампициллину, новобиоцину, хлорамфениколу, оксипиллину, полимиксину, бензилпенициллину и ванкомицину, но устойчив к действию канамицина (все антибиотики тестировались в концентрации 50 мкг/мл).

Анализ состава жирных кислот клетки показал, что ai-C15:0 является мажорным компонентом, на долю которого приходится 66.0% от общего количества жирных кислот. Кроме того были детектированы следующие жирные кислоты: ai-C17:0 (14.3%), C16:0 (7.3%), i-C16:0 (6.0%), C18:0 (2.3%), i-C15:0 (2.0%), C14:0 (1.2%) и C15:0 (0.9%). Доминирующим хиноном был МК-7.

Филогенетический анализ показал, что организм 3408-1^T относится к семейству *Thermoanaerobacteraceae* и наиболее близок к представителям рода *Ammonifex* (рис. 6). Однако, последовательность гена 16S рНК штамма 3408-1^T имеет лишь 93% сходства с аналогичными последовательностями *A. degensii* и *A. thiophilus*.

На основании вышеприведённых результатов нами был предложен новый род '*Desulfothermobacter*' с типовым видом '*Desulfothermobacter acidiphilus*'.

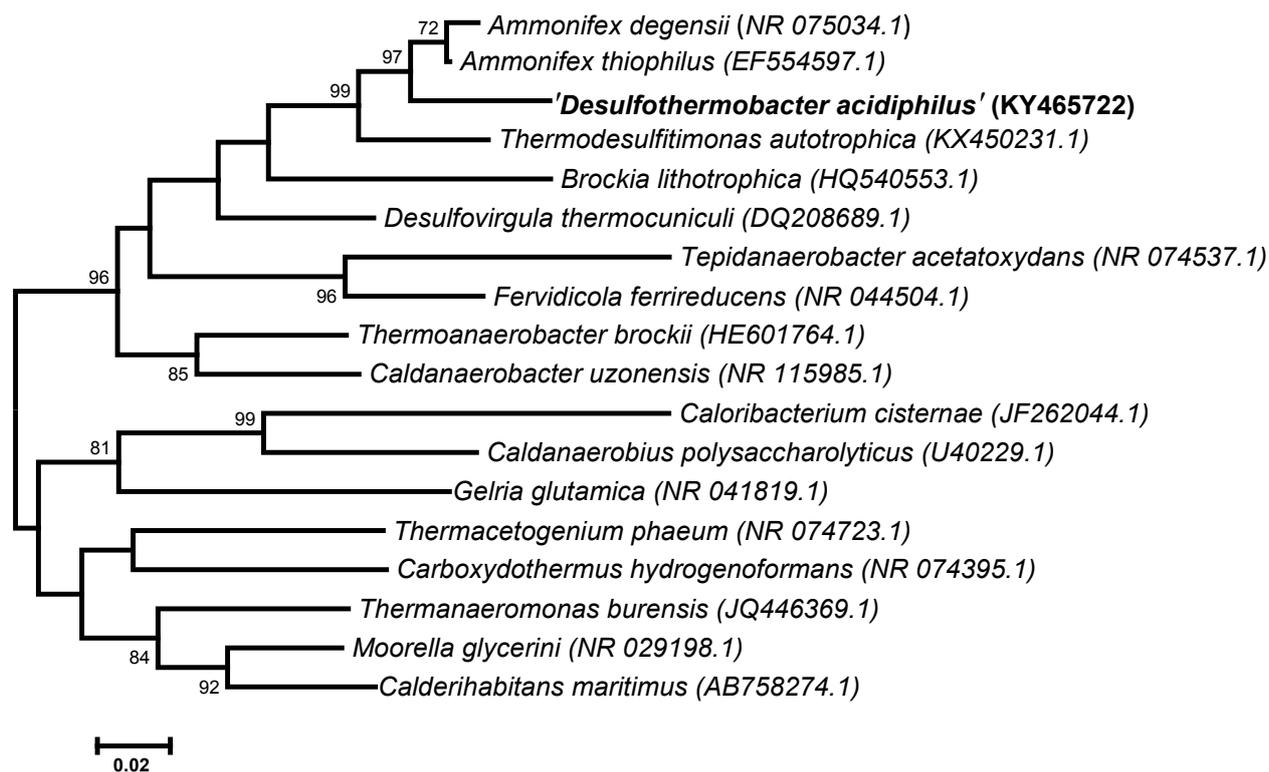


Рис. 6. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе сравнения последовательностей гена 16S рНК штамма 3408-1^T и некоторых родственных видов в семействе *Thermoanaerobacteraceae*.

Микробное сообщество источника Солнечный. Для анализа состава микробного сообщества в источнике Солнечный в результате секвенирования было получено 97113 последовательностей гена 16S рНК со средней длиной 254 нуклеотида. Полученные прочтения были сгруппированы в операционные таксономические единицы (ОТЕ) с уровнем сходства более 97% с нуклеотидными

последовательностями из баз данных. Всего было получено 1316 ОТЕ бактерий и архей. Оценку α -разнообразия производили с помощью индекса Шеннона, который для источника Солнечный составил 6.99, характеризуя тем самым высокое разнообразие прокариот. Прогнозируемое конечное количество ОТЕ для источника Солнечный составило 1412, следовательно, покрытие, рассчитанное с помощью Chao1, равно 93.3%. Таким образом, это свидетельствует о том, что основные группы микроорганизмов были идентифицированы.

Доля последовательностей бактерий в полученной библиотеке генов 16S рРНК источника Солнечный составляет 94.54% от общего количества последовательностей, на долю архей приходилось только 2.94% (рис. 7.). Для 2.53% последовательностей не удалось определить их принадлежность. Среди последовательностей *Deltaproteobacteria* были выявлены гены, принадлежащие сульфатредуцирующим бактериям родов *Thermodesulforhabdus* (1.63% от общего числа последовательностей), *Desulfosoma* (0.89%), *Desulfobacca* (0.11%), *Desulfomonile* (0.04%), а также порядков *Desulfobacterales* (0.36%) и *Desulfovibrionales* (0.06%). Среди последовательностей *Firmicutes* были выявлены последовательности СРП, относящихся к роду *Ammonifex* (0.05%), а среди последовательностей *Nitrospirae* - к роду *Thermodesulfovibrio* (0.9%). Таким образом, СРП в источнике Солнечный отличаются высоким разнообразием и суммарно составляют около 4% от общего числа микроорганизмов. Последовательностей архей, потенциально способных к сульфатредукции, в полученной библиотеке выявлено не было.

К сожалению, нам не удалось получить накопительные и чистые культуры СРП, растущих при $pH < 6.0$, однако, был получен ряд накопительных культур, восстанавливающих сульфат на средах с нейтральным значением pH. Таким образом, в источнике Солнечном все СРП были представлены нейтрофильными видами.

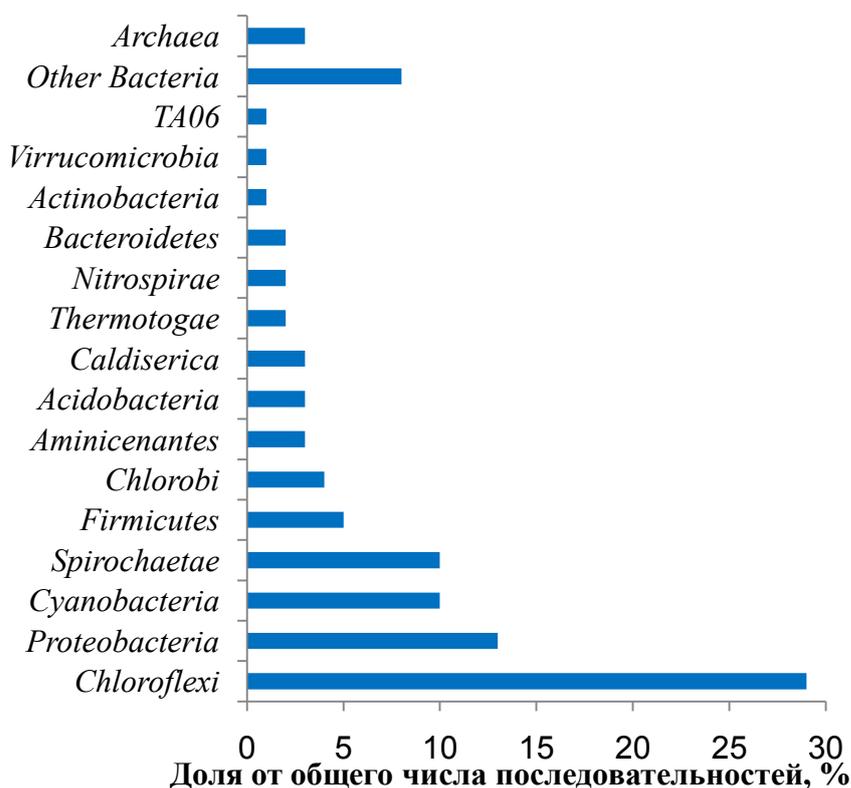


Рис. 7. Состав микробного сообщества источника Солнечный.

Анализ состава микробного сообщества в источнике Орешек. Для анализа состава микробного сообщества в источнике Орешек в результате секвенирования было получено 473524 последовательности гена 16S рНК бактерий и архей со средней длиной 254 нуклеотида, которые были сгруппированы в 386 ОТЕ бактерий и архей. Индекс Шеннона для источника Орешек составил 4.26, характеризуя, тем самым, умеренное разнообразие прокариот. Была проведена оценка прогнозируемого конечного количества ОТЕ методом Chao1, который позволяет спрогнозировать конечное количество ОТЕ, исходя из рассматриваемой выборки, при этом при экстраполяции учитывается количество ОТЕ, которые представлены только одним и только двумя прочтениями. Прогнозируемое конечное количество ОТЕ для источника Орешек составило 462, следовательно, покрытие, рассчитанное с помощью Chao1, равно 83.6%. Таким образом, это свидетельствует о том, что основные группы микроорганизмов были идентифицированы.

Основу микробного сообщества в источнике Орешек составляли археи, на долю которых в полученной библиотеке генов 16S рНК приходилось 86.62% от общего числа генов. На долю последовательностей бактерий приходилось 9.39% (рис. 8). Для 3.99% последовательностей не удалось определить их принадлежность. Последовательности архей принадлежали представителям трёх филумов: *Crenarchaeota* (57.72% от всех последовательностей в библиотеке), *Thaumarchaeota* (21.15%) и *Euryarchaeota* (7.75%). Среди последовательностей архей, потенциально способных к сульфатредукции, были выявлены гены представителей родов *Vulcanisaeta*, *Thermoproteus* и *Caldivirga*, составляющие 20.15%, 8.46% и 1.01% от общего числа последовательностей в библиотеке, соответственно (рис. 9). Среди последовательностей бактерий нам не удалось выявить гены микроорганизмов, потенциально способных к сульфатредукции.

Анализ состава микробного сообщества в источнике 3423 на Западном поле в кальдере вулкана Узон. В результате высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рНК из источника 3423 было получено 250946 последовательностей со средней длиной 254 нуклеотида, при анализе которых было получено 274 ОТЕ бактерий и архей. Индекс Шеннона для источника 3423 составил 3.4, характеризуя тем самым умеренное разнообразие прокариот. Прогнозируемое конечное количество ОТЕ для источника 3423 составило 323, следовательно, покрытие, рассчитанное с помощью Chao1 равно 84.8%.

В полученной библиотеке генов 16S рНК из источника 3423 последовательности архей составляют 97.43%, в то время как на долю последовательностей бактерий приходилось 1.99%. Последовательности архей принадлежали представителям четырёх филумов: *Nanoarchaeota* (36.02% от общего количества последовательностей), *Aigarchaeota* (28.62%), *Euryarchaeota* (16.71 %) и *Crenarchaeota* (15.80 %) (рис. 8). Среди последовательностей архей, потенциально способных к сульфатредукции, были выявлены гены родов *Vulcanisaeta* (6.01% от общего числа последовательностей) и *Thermoproteus* (3.11%) (рис. 9). Среди последовательностей бактерий нам не удалось выявить гены организмов, потенциально способных к сульфатредукции. Таким образом, микробное сообщество из источника 3423 по своему составу оказалось очень похожим на микробное сообщество из источника Орешек, несмотря на более высокое значение рН (5.0 против 3.5) и более низкую температуру (72 °С против 92 °С).

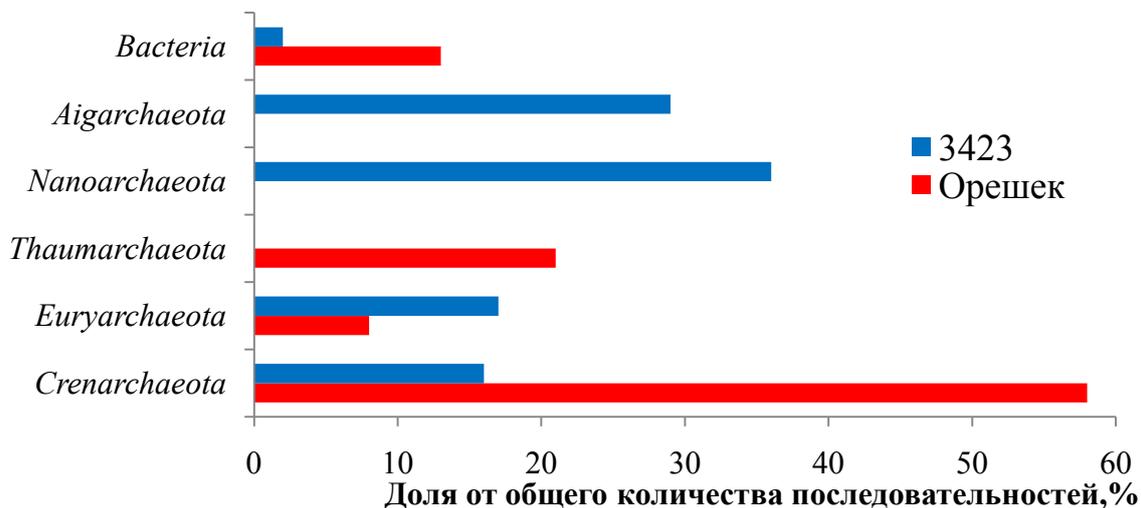


Рис. 8. Состав микробных сообществ из источников Орешек и 3423.

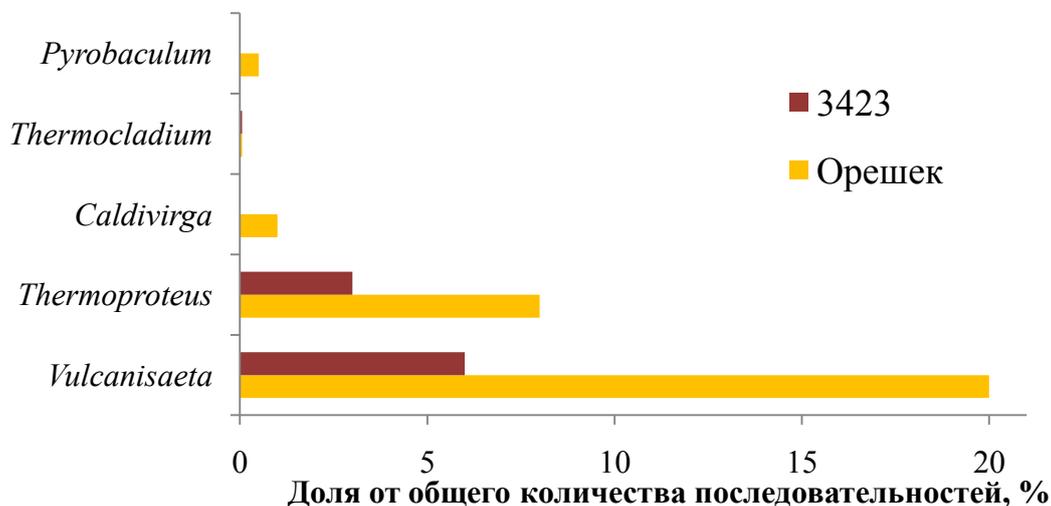


Рис. 9. Состав семейства *Thermoproteaceae* в источниках Орешек и 3423

Накопительная культура из источника Орешек. Из источника Орешек нами была получена сульфатредуцирующая накопительная культура, растущая в хемоорганогетеротрофных условиях с дрожжевым экстрактом в качестве субстрата. Использование ацетата, лактата, метанола, этанола и водорода не способствовало сульфатредукции. Накопительная культура оптимально росла при 85°C и pH 4.5. В процессе роста происходило образование до 3.5 мМ сульфида с эквимолярным потреблением сульфата. С помощью ДГГЭ анализа генов 16S рРНК было установлено, что ассоциация состоит из трёх компонентов, обозначенных 3102-1, 3102-2, и 3102-3, относящихся к археям филума *Crenarchaeota*. Филогенетический анализ показал, что организм 3102-1 имел 100% сходство последовательностей генов *dsrAB* и 16S рРНК с таковыми у описанной ранее археи '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' (Prokofeva *et al.*, 2005). Исходя из геномных данных (Gumerov *et al.*, 2011), можно предположить, что '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28', а, следовательно, и организм 3102-1, скорее всего, выполняет процесс диссимиляционной сульфатредукции. Второй компонент, 3102-2, оказался филогенетически близок *T. uzoniensis* 768-20 (99% сходства последовательностей

генов 16S рРНК), который, согласно геномным данным, способен к сероредукции, но не к сульфатредукции, так как в его геноме отсутствует ген ключевого фермента сульфатредукции – *dsrA* (Mardanov *et al.*, 2011). Третий компонент, 3102-3, был родственен *Fervidococcus fontis* (99% сходства генов 16S рРНК), и также как в случае с *T. uzoniensis*, является серовосстанавливающим организмом и не способен к сульфатредукции, что также подтверждается имеющимися в литературе данными (Perevalova *et al.*, 2010; Lebedinsky *et al.*, 2014). К сожалению, нам не удалось разделить данные компоненты, а при последующем культивировании первые два компонента практически полностью исчезли, что вероятно объясняется более высокими темпами роста компонента 3102-3 (*Fervidococcus fontis*) и его способностью к сбраживанию органических субстратов.

Таким образом, можно предположить, что сульфатредукция в источнике Орешек осуществляется археями, относящимися к филуму *Crenarchaeota* и конкретно '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28'.

Проверка способности ряда коллекционных культур к сульфатному дыханию. Согласно литературным данным, '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' (Gumerov *et al.*, 2011), *C. maquilingensis* (Itoh *et al.*, 1999), *T. tenax* (Siebers *et al.*, 2011), *V. souniana* (Itoh *et al.*, 2002) и *V. distribute* (Itoh *et al.*, 2002) могут восстанавливать сульфат до сульфида. Однако до настоящего времени экспериментальные доказательства данного процесса у вышеназванных представителей филума *Crenarchaeota* не были представлены. В связи с тем, что способность данных организмов к сульфатредукции важна не только для определения экологических границ процесса, но и для понимания эволюции СРП, мы экспериментально проверили способность к сульфатредукции у коллекционных штаммов.

Был проведён анализ геномов у представителей родов *Vulcanisaeta*, *Caldivirga* и *Thermoproteus* с целью выявления наличия необходимого набора генов сульфатредукции (Pereira *et al.*, 2011). Геномный анализ показал, что только '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' имеет необходимый набор генов, в то время как у *T. tenax*, *V. distribute* и *C. maquilingensis* отсутствовали гены *qmoABC*. Геном *V. souniana* в настоящее время доступен, однако качество секвенирования и сборки не позволяют провести полноценный анализ. Аналогичная работа была проделана и со всеми доступными в базах NCBI геномами архей. Анализ показал, что среди других архей к сульфатредукции способны только представители рода *Archaeoglobus*, что является давно известным фактом. Однако, основные гены сульфатредукции, включая *dsrAB*, имеют у *Archaeoglobus* бактериальное происхождение.

Филогенетический анализ генов *dsrAB* из баз данных NCBI показал (рис. 10 и 11), что эти гены представлены как бактериальными, так и архейными линиями. Важно отметить, что гены *dsrAB* из '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28', *T. tenax*, *V. distribute*, *V. souniana* и *C. maquilingensis* имеют архейное происхождение. Наибольший интерес вызывает '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28', так как она имеет весь необходимый набор генов, включая *qmoABC*, однако, не стоит забывать о четырёх других претендентах, которые, несмотря на отсутствие генов комплекса *Qmo*, могут быть способны к сульфатредукции за счёт новых неизвестных белков. Окончательный ответ на этот вопрос был получен после работы с культурами данных организмов.

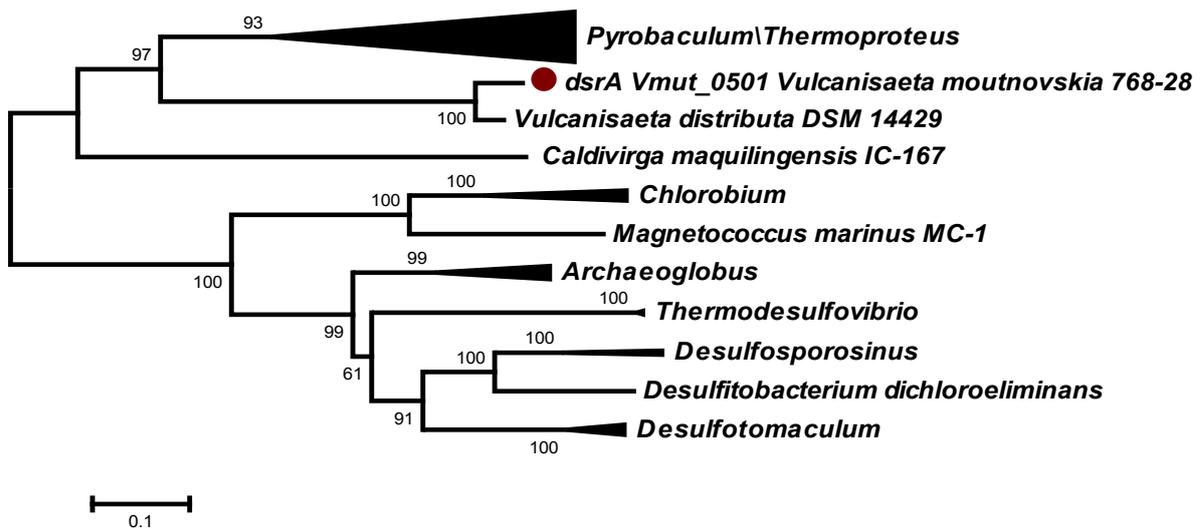


Рис. 10. Филогенетическое дерево, построенное на основании анализа аминокислотных последовательностей DsrA у сульфатредуцирующих архей (*Archaeoglobus* и '*Candidatus V. moutnovskia 768-28*') и бактерий. Видно, что последовательность гена *dsrA* представителей рода *Archaeoglobus* находится в бактериальном кластере.

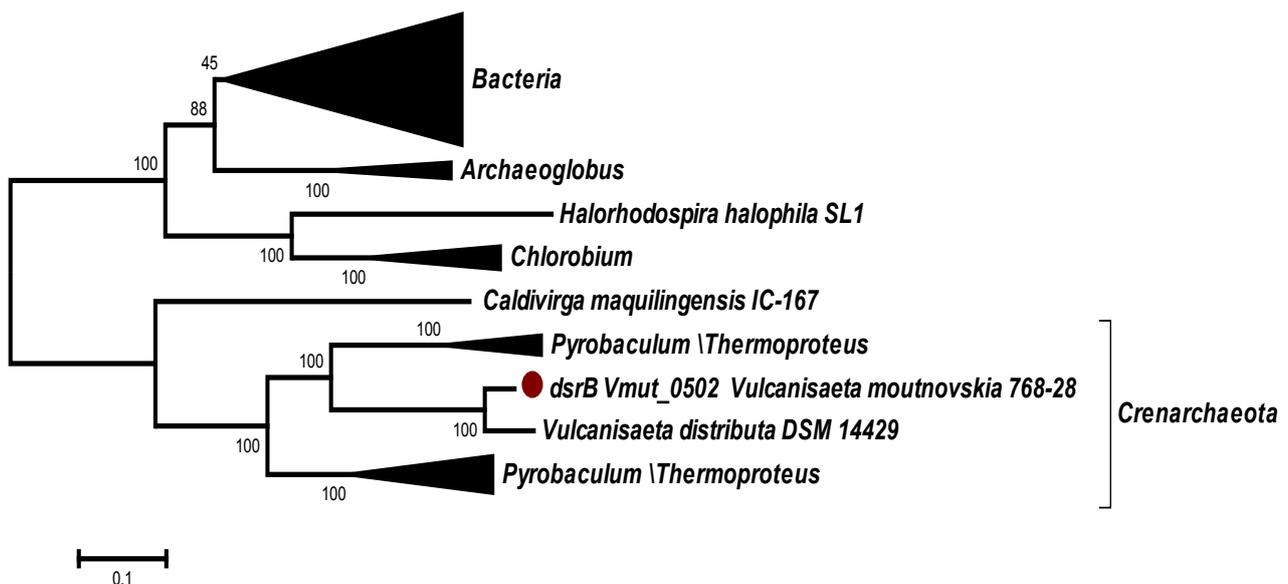


Рис. 11. Филогенетическое дерево, построенное на основании анализа аминокислотных последовательностей DsrB у сульфатредуцирующих архей (*Archaeoglobus* и '*Candidatus V. moutnovskia 768-28*') и бактерий. Видно, что последовательность гена *dsrB* представителей рода *Archaeoglobus* находится в бактериальном кластере.

В результате анаэробного культивирования на средах, содержащих 1 г/л сульфата и 1 г/л дрожжевого экстракта, при значениях pH, соответствующих оптимуму роста, было показано, что коллекционные культуры *T. tenax*, *V. distributa*, *V. souniana* и *C. maquilingensis* в первых двух пересевах имели очень слабый рост, а в третьем пересеве ни одна из перечисленных культур не росла. В отличие от коллекционных штаммов бинарная культура показала устойчивый сульфидогенный рост на сульфатной среде. В качестве энергетического субстрата использовали только дрожжевой экстракт или пептон. Попытки подобрать более простой субстрат

(аминокислоты, сахара, органические кислоты, спирты и т.д.) не привели к положительному результату. Были предприняты неоднократные попытки разделения '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' и *T. uzoniensis* 768-20, которые не увенчались успехом.

Бинарная культура росла в интервале температур от 65 до 98°C с оптимумом при 85°C и в интервале pH от 3.8 до 6.0 с оптимумом 4.8–5.0. Нами была показана зависимость роста от концентрации сульфата в среде, когда добавление 7.5 мМ сульфата способствовало увеличению прироста биомассы в 3 раза. Рост бинарной культуры сопровождался образованием 2 мМ сульфида и эквивалентным потреблением сульфата (рис. 12). Культура была способна к использованию серы вместо сульфата в качестве терминального акцептора электронов. С помощью метода количественной ПЦР было установлено, что при культивировании на сульфатной среде доминирующим компонентом является '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28', так как доля сопутствующего организма *T. uzoniensis* 768-20 составляла 0.01–0.1% от общего числа клеток. Аналогичным образом было показано, что при росте на среде с элементной серой соотношение двух компонентов примерно было равно 1:1. Исходя из вышесказанного, можно утверждать, что архея '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' способна как к диссимиляционной сульфатредукции, так и к сероредукции, в то время как *T. uzoniensis* 768-20 способен использовать в качестве терминального акцептора электронов только серу. Эти выводы хорошо согласуются с геномными данными.

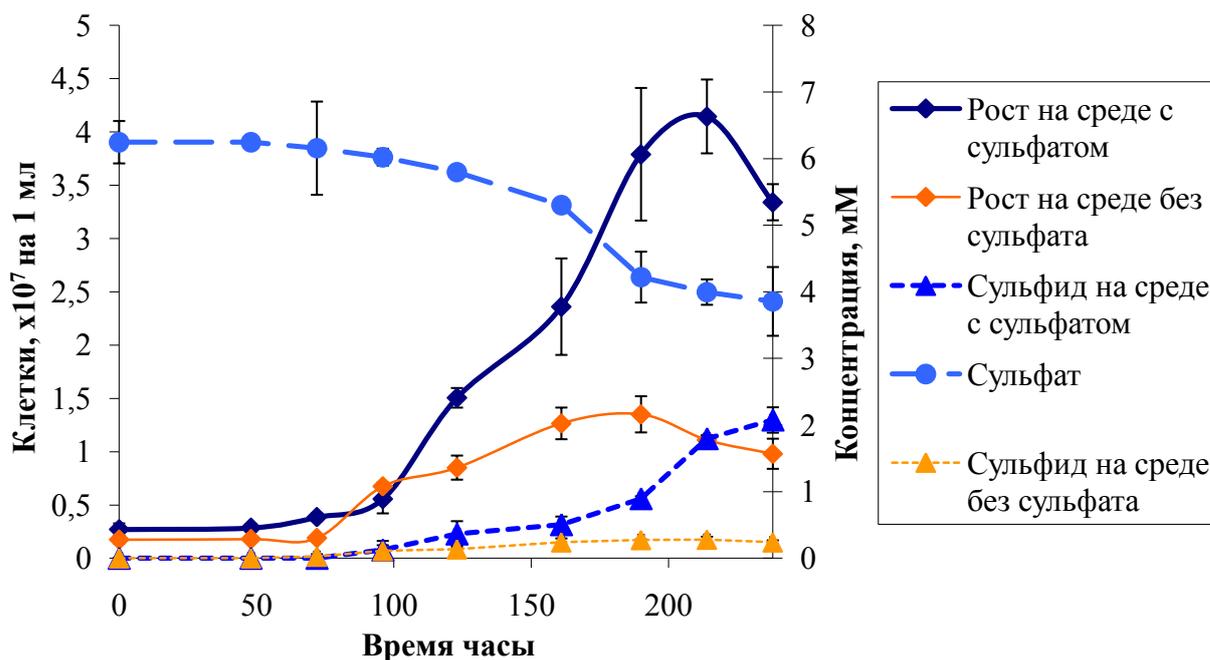


Рис. 12. Сульфидогенный рост бинарной культуры, состоящей из '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' и *T. uzoniensis* 768-20, на сульфатной среде.

Способность коллекционных штаммов и бинарной культуры к диссимиляционной сульфатредукции определяли с использованием $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ в ходе радиоизотопных исследований. Показано, что интенсивность сульфатредукции у бинарной культуры составляет 1.055 фмоль S^{2-} /(клетка·сутки) (рис. 10). Данное значение попадает в интервал от 0.16 до 417 фмоль S^{2-} /(клетка·сутки), который был экспериментально показан для сульфатредуцирующих микроорганизмов (Jorgensen, 1978; Brüchert *et al.*, 2001; Kleikemper *et al.*, 2004; Meier *et al.*, 2012). Эти данные

подтверждают способность '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' к сульфатредукции. Значения, показанные для *C. maquilingensis*, *T. tenax*, *V. distribute* и *V. souniana*, были значительно меньше нижней границы необходимого уровня клеточной интенсивности сульфатредукции, из чего можно сделать вывод об их неспособности к сульфатредукции (рис. 13).

В связи с тем, что бинарная культура способна как к сульфатредукции, так и к сероредукции, необходимо было установить, какой из акцепторов электронов является наиболее предпочтительным. Был поставлен эксперимент, в котором проводилось измерение интенсивности сульфатредукции на среде одновременно содержащей сульфат (1 г/л) и элементную серу (10 г/л). Показано, что добавление элементной серы снижает интенсивность сульфатредукции более чем в 54 раза, тем самым процесс сульфатредукции практически прекращается. Таким образом, сера является более предпочтительным акцептором электронов для '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28'.

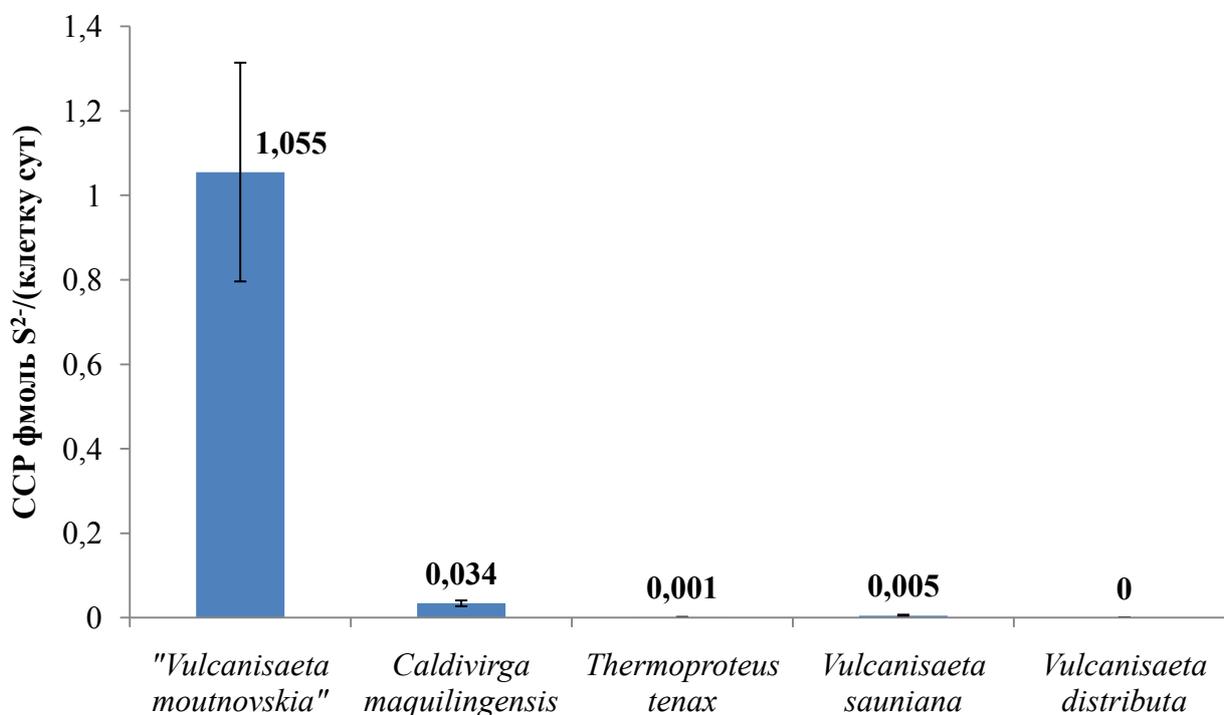


Рис. 13. Скорость сульфатредукции у '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28', *T. tenax*, *V. distribute*, *V. souniana* и *C. maquilingensis*.

С использованием методов жидкостной хроматографии и масс-спектрометрического анализа нами был получен и проанализирован протеом бинарной культуры при росте на сульфатной среде и среде, содержащей элементную серу (табл. 2). Использованный нами метод, к сожалению, позволил определить и проанализировать только растворимые цитоплазматические и периплазматические белки, однако следует учесть, что большая часть белков, участвующих в сульфатредукции, является растворимыми (11 из 15). Установлено, что данные растворимые белки, участвующие в сульфатредукции, присутствуют при культивировании бинарной культуры на сульфатной среде и закодированы в геноме '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28'. Важно отметить, что Sat, DsrA, DsrB и AprA

относятся к числу наиболее многочисленных белков клетки. При культивировании бинарной культуры на среде с элементной серой были детектированы только следовые количества 4 белков – DsrA, DsrC, DsrB и AprA, характерных для генома '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28'. Результаты протеомного анализа *T. uzoniensis* 768-20 показали, что данный организм не способен к диссимиляционной сульфатредукции, так как из необходимого набора белков сульфатредукции были обнаружены только Sat, AprA и AprB.

Таким образом, нам удалось доказать, что только '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28', входящая в состав бинарной культуры, способна к диссимиляционной сульфатредукции, и, следовательно, отвечает за процесс сульфатредукции в источнике Орешек, что также подтверждается результатами работы с трёхкомпонентной накопительной культурой, в которой был выявлен данный организм.

Табл. 2. Результаты анализа протеома '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' и *T. uzoniensis* 768-20 по ключевым белкам сульфатредукции

Белок	% от общего количества белков			
	Акцентор - SO ₄ ²⁻		Акцентор - S ⁰	
	' <i>Candidatus V. moutnovskia</i> 768-28'	<i>T. uzoniensis</i> 768-20	' <i>Candidatus V. moutnovskia</i> 768-28'	<i>T. uzoniensis</i> 768-20
Sat	0.338	0.083	-	0.054
AprA	0.538	0.021	0.029	0.034
AprB	0.057	0.008	-	0.024
DsrA	0.266	-	0.005	-
DsrB	0.532	-	0.078	-
DsrC	0.094	-	0.003	-
DsrK	0.090	-	-	-
QmoA	0.047	-	-	-
QmoB	0.043	-	-	-
"QmoA"	0.047	-	-	-
"QmoB"	0.146	-	-	-
QmoC	Трансмембранные белки, в анализе не участвовали			
DsrM				
Пирофосфатаза				
Сульфатный переносчик				

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На момент начала данной работы в научной литературе почти полностью отсутствовали данные по термоацидофильной сульфатредукции и микроорганизмам, которые осуществляют данный процесс.

В ходе выполнения исследования нами был выявлен ряд кислых термальных источников с умеренной скоростью сульфатредукции (от 1 до 12.9 нмоль SO₄/((см³·сут)) и определено влияние ряда субстратов на активность СРП. Ранее процесс термоацидофильной сульфатредукции был показан для пяти источников национального парка Йеллоустон, интенсивность в которых варьировала в

интервале от 1 до 704 нмоль $S^{2-}/(см^3 \cdot сут)$ (Roychoudhury, 2004; Fishbain *et al.*, 2003). При этом наибольшие значения скорости сульфатредукции в данных источниках были обнаружены только в микробных матах, в то время как значения интенсивности процесса для осадков соответствовали полученным нами результатам.

Впервые нами была определена не только активность СРП, но и были выявлены агенты диссимиляционной сульфатредукции в кислых термальных источниках. До настоящего времени был описан только один термоацидофильный сульфатредуцирующий микроорганизм – *Th. narugense* (Mori *et al.*, 2003). В процессе выполнения данной работы были получены и описаны два новых сульфатредуцирующих микроорганизма – *Th. acidiphilum* sp. nov. и '*Desulfothermobacter acidiphilus*' gen. nov., sp. nov.

Для источников Орешек и 3423 (Западное поле) нами была определён и проанализирован состав микробного сообщества, что позволило предположить в качестве микроорганизмов, ответственных за процесс сульфатредукции, представителей филума *Crenarchaeota*. Работа с лабораторными культурами, результаты радиоизотопных экспериментов, а также данные геномного и протеомного анализов показали, что только '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' способна к осуществлению диссимиляционной сульфатредукции, в то время как *C. maquilingensis*, *T. tenax*, *V. souniana* и *V. distribute* таким свойством не обладают. Основываясь на полученных результатах, мы предлагаем общую схему процесса диссимиляционной сульфатредукции для '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' (рис. 14).

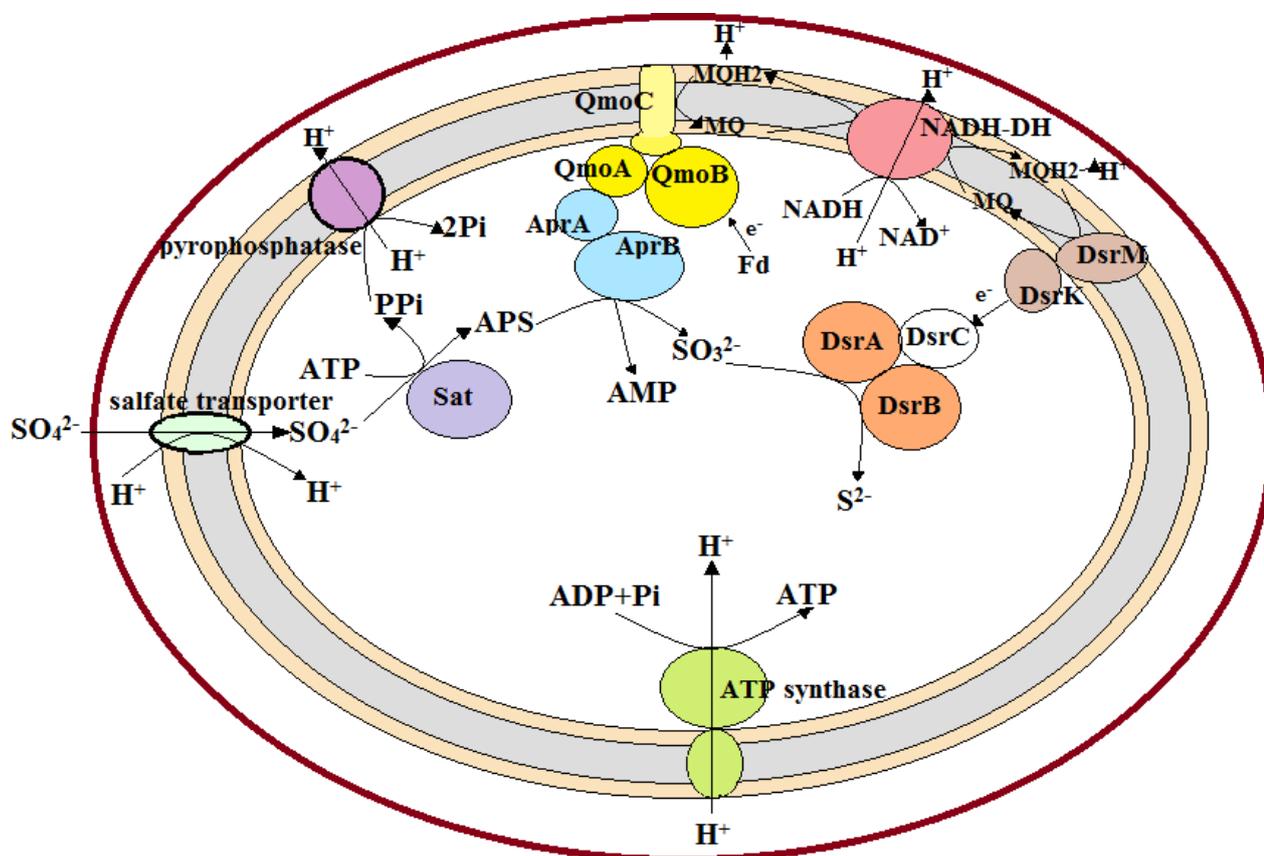


Рис. 14. Общая схема диссимиляционной сульфатредукции у '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28'.

Филогенетический анализ ключевых генов сульфатредукции для '*Candidatus V. moutnovskia 768-28*' показал их архейное происхождение, что имеет большое значение для понимания эволюции СРП. Наличие бактериальной и архейной ветвей генов сульфатредукции на филогенетическом древе свидетельствует об их общем происхождении у так называемого LUCA (last universal common ancestor), который предположительно обитал в раннем Архее (Koonin & Martin, 2005; Mulkidjanian *et al.*, 2012; David & Alm, 2011). Кроме того, данный вывод согласуется с геологическими данными по фракционированию стабильных изотопов серы в породе возрастом 3.47 млрд. лет, что может свидетельствовать о протекании сульфатредукции в раннем Архее (Shen *et al.*, 2001).

ВЫВОДЫ

1) Показана высокая потенциальная скорость сульфатредукции в ряде кислых термальных источников Камчатки и определён состав микробных сообществ в них.

2) Показано, что в источниках с экстремально термоацидофильными условиями процесс сульфатредукции осуществляют археи, а в источниках с умеренно термоацидофильными условиями за данный процесс отвечают бактерии.

3) Выделен в чистую культуру и описан новый вид термоацидофильной сульфатредуцирующей бактерии *Thermodesulfobium acidiphilum* sp. nov.

4) Выделена в чистую культуру и отнесена к новому роду и виду термоацидофильная сульфатредуцирующая бактерия '*Desulfothermobacter acidiphilus*' gen. nov., sp. nov.

5) Показано, что среди исследованных представителей домена *Archaea* только '*Candidatus V. moutnovskia 768-28*' обладает необходимым набором генов диссимиляционной сульфатредукции. Филогенетический анализ ключевых генов сульфатредукции из '*Candidatus V. moutnovskia 768-28*' показал их архейное происхождение.

6) С помощью культурального, радиоизотопного и протеомного методов исследования получены экспериментальные доказательства осуществления процесса диссимиляционной сульфатредукции у '*Candidatus V. moutnovskia 768-28*'.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Экспериментальные статьи

1) **Фролов Е.Н.**, Меркель А.Ю., Пименов Н.В., Хвашевская А.А., Бонч-Осмоловская Е.А., Черных Н.А. Сульфатредукция и ассимиляция неорганического углерода в кислых термальных источниках полуострова Камчатка // Микробиология. - 2016. - Т. 85. - № 4. - С. 446-457.

2) Merkel A.Yu., Dubin A.V., Pimenov N.V., Rusanov I.I., Slobodkin A.I., Slobodkina G.B., Tarnovetckii I. Yu., **Frolov E.N.**, Perevalova A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. Lithoautotrophic microbial communities in Kamchatka hot springs // Extremophiles. - 2017. - V. 21. - № 2. - P. 307-317.

3) **Frolov E.N.**, Kublanov I.V., Toshchakov S.V., Samarov N. I., Novikov A.A., Lebedinsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Chernyh N.A. *Thermodesulfobium acidiphilum* sp. nov., a new thermoacidophilic sulfate-reducing chemoautotrophic bacterium from a Kamchatkan thermal site // IJSEM. accepted (DOI: 10.1099/ijsem.0.001745).

Тезисы конференций

1) **Frolov E.N.**, Prokofeva M.I., Pimenov N.V., Miroshnichenko M.L., Lebedinsky A.V. Bonch-Osmolovskaya E.A., Chernyh N.A. Dissimilatory sulfate reduction in the crenarchaeote “*Vulcanisaeta moutnovskia*”. The 10th International Congress on Extremophiles. Saint Petersburg (Russia). September 7-11, 2014. P. 93.

2) **Фролов Е.Н.**, Прокофьева М.И., Пименов Н.В., Мирошниченко М.Л., Лебединский А.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Черных Н.А. Диссимиляционная сульфатредукция у представителя класса Crenarchaeota “*Vulcanisaeta moutnovskia*”. Всероссийский симпозиум с международным участием Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов. Москва (Россия). 24-27 Декабря, 2014. С. 241.

3) Chernyh N.A., **Frolov E.N.**, Merkel A.Yu., Pimenov N.V., Lebedinsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. What are the agents of dissimilatory sulfate reduction in acidic thermal springs of Kamchatka? The 13th International Conference on Thermophiles. Santjago (Chile). August 29-September 4, 2015. P. 38.

4) **Frolov E.N.**, Kublanov I.V., Toshchakov S.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Chernyh N.A. Peculiarities of autotrophic growth *Thermodesulfobium acidiphilum* sp. nov. strain 3127-1^T, a new thermophilic sulfate reducing isolate from a hot spring of Kamchatka. Gordon Research Conference on Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism. Waterville Valley (USA). July 30 - August 5, 2016. P. 27.