

Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»

На правах рукописи

Фролов Евгений Николаевич

**СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИЕ ПРОКАРИОТЫ КИСЛЫХ
ТЕРМАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ ПОЛУОСТРОВА КАМЧАТКА**

Специальность 03.02.03 –Микробиология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Черных Н.А.

Москва 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	11
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Механизм сульфатредукции.....	13
1.1.1. Транспорт и активация сульфата.....	13
1.1.2. Восстановление АФС.....	15
1.1.3. Восстановление сульфита.....	16
1.1.4. Мембранные комплексы, необходимые для осуществления сульфатредукции.....	19
1.2. Разнообразие СРП.....	22
1.3. Эволюция СРП.....	24
1.4. Экология СРП.....	26
1.4.1. Сульфатредукция в кислых местообитаниях.....	27
1.4.1.1. Факторы, оказывающие влияние на СРП при низких значениях рН.....	28
1.4.1.2. Интенсивность сульфатредукции в кислых местообитаниях.....	33
1.4.1.3. Лабораторные культуры ацидофильных СРП.....	37
1.4.2. Сульфатредукция в условиях высоких температур.....	41
1.4.2.1. Континентальные кислые термальные источники.....	42
1.4.2.2. Интенсивность сульфатредукции в геотермальных источниках.....	43
1.4.2.3. Термоацидофильные СРП.....	48
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	50
2.1. Объекты исследования.....	50
2.2. Методы исследования.....	50
2.2.1. Отбор проб.....	50
2.2.2. Определение активности СРП с помощью радиоизотопных методов.....	51
2.2.3. Приготовление среды для термоацидофильных СРП.....	52
2.2.4. Получение чистых культур.....	55

2.2.5. Исследование морфологии и тонкого строения клеток.....	55
2.2.6. Аналитические методы исследования.....	56
2.2.7. Хемотаксономический анализ.....	59
2.2.8. Выделение ДНК.....	59
2.2.9. Подготовка библиотеки фрагментов генов 16S рРНК.....	61
2.2.10. Секвенирование и анализ результатов при определении состава микробного сообщества.....	62
2.2.11. Полимеразная цепная реакция.....	63
2.2.12. ДГГЕ-анализ.....	65
2.2.13. Определение последовательности гена 16S рРНК.....	65
2.2.14. Филогенетический анализ.....	65
2.2.15. Определение последовательности полного генома.....	66
2.2.16. Исследование протеома у ' <i>Candidatus</i> V. moutnovskia 768-28' и <i>T. izoniensis</i> 768-20.....	66
2.2.17. Статистическая обработка данных.....	68
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСЖДЕНИЕ.....	69
3.1. Характеристика кислых термальных источников, отобранных для измерения активности СРП.....	69
3.2. Активность СРП в источниках.....	72
3.3. Выделение и описание новой термоацидофильной бактерии <i>ThermodesulFOBium acidiphilum</i> sp.nov.....	74
3.3.1. Морфология штамма 3127-1 ^T	74
3.3.2. Характеристики роста штамма 3127-1 ^T	74
3.3.3. Метаболизм штамма 3127-1 ^T	77
3.3.4. Отношение к антибиотикам штамма 3127-1 ^T	78
3.3.5. Состав жирных кислот, липидов мембран и хинонов у штамма 3127-1 ^T	78
3.3.6. Геносистематические характеристики штамма 3127-1 ^T	78
3.4. Выделение и описание новой термоацидофильной бактерии ' <i>DesulFOthermobacter acidiphilus</i> ' gen. nov., sp. nov.....	81

3.4.1. Морфология штамма 3408-1 ^T	81
3.4.2. Характеристики роста штамма 3408-1 ^T	81
3.4.3. Метаболизм штамма 3408-1 ^T	83
3.4.4. Отношение к антибиотикам штамма 3408-1 ^T	84
3.4.5. Состав жирных кислот, липидов мембран и хинонов у штамма 3408-1 ^T	84
3.4.6. Геносистематические характеристики штамма 3408-1 ^T	84
3.5. Микробное сообщество источника Солнечный.....	85
3.6. Анализ состава микробного сообщества в источнике Орешек	87
3.7. Анализ состава микробного сообщества в источнике 3423 на Западном поле в кальдере вулкана Узон.....	88
3.8. Накопительная культура из источника Орешек.....	89
3.9. Проверка способности ряда коллекционных культур к сульфатному дыханию.....	91
3.9.1. Геномный анализ.....	91
3.9.2. Филогенетический анализ ключевых генов сульфатредукции.....	93
3.9.3. Культивирование коллекционных культур.....	94
3.9.4. Радиоизотопные исследования с использованием Na ₂ ³⁵ SO ₄	98
3.9.5. Анализ протеома бинарной культуры.....	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	104
ВЫВОДЫ.....	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	107
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	136

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АМФ – аденозинмонофосфорная кислота;

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота;

АФС – аденозинфосфосульфат;

ДГГЭ – денатурирующий градиентный гель-электрофорез;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

СРП – сульфатредуцирующие прокариоты;

ССР – скорость сульфатредукции;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;

ЭТЦ – электронтранспортная цепь;

Arg – аденозинфосфосульфат редуктаза;

CHAPS – (3-[(3-Холанидопропил) диметиламмоний]-1-пропансульфонат);

LC-MS/MS – метод жидкостной хроматографии / тандемной масс-спектрометрии;

Dsr – диссимиляционная сульфитредуктаза;

PPi – пиррофосфат;

TSEP·HCl – Трис-(2-карбоксиэтил) фосфин гидрохлорид;

Qmo – хинон-взаимодействующий мембрансвязанный оксидоредуктазный комплекс;

Sat – АТФ-сульфурилаза;

SDS – додецилсульфат натрия;

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Диссимиляционная сульфатредукция - важнейший природный процесс, который широко распространён в анаэробных местообитаниях и осуществляется только прокариотами (Muyzer & 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 maquilingsis* (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. uzoniensis* штамм 768-20, исследована способность к диссимиляционной сульфатредукции. Показано, что только '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' способна к сульфатному дыханию. Таким образом, впервые получены экспериментальные доказательства процесса диссимиляционной сульфатредукции у представителей домена *Archaeota*. 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 *Arhaea* 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. maquilensis*, *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).

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 (2 главы), заключения, выводов, приложения и списка литературы, который содержит 237 наименований.

Место проведения работы и благодарности. 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. Тошакова С.В. Исследование протеома было выполнено под руководством проф. Голышина П.Н. на базе School of Biological Sciences, Bangor University (Великобритания).

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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Экспериментальные статьи

1) **Фролов Е.Н.**, Меркель А.Ю., Пименов Н.В., Хващевская 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., Tarnovetskii 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Сульфатредуцирующие прокариоты (СРП) представляют собой анаэробные микроорганизмы, использующие сульфат в качестве терминального акцептора электронов. Донорами электронов выступают различные органические, как правило, низкомолекулярные соединения, а также водород, которые образуются на начальных стадиях деструкции органической материи сообществом анаэробных микроорганизмов, кроме того, водород может иметь ювенальное происхождение в районах активной тектонической деятельности. Тем самым СРП играют ключевую роль, как в цикле серы, так и в цикле углерода.

1.1. Механизм сульфатредукции

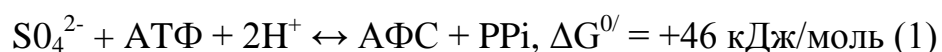
Диссимиляционная сульфатредукция – внутриклеточный процесс, в ходе которого происходит восьмиэлектронное восстановление сульфата до сульфида, с образованием бисульфита в качестве промежуточного продукта. К минимальному набору белков необходимых для осуществления сульфатредукции относят сульфатный транспортер, АТФ-сульфурилазу (Sat), пиррофосфатазу, АФС-редуктазу (ArgAB), ферредоксин, хинон-взаимодействующий мембраносвязанный оксидоредуктазный комплекс (QmoABC), диссимиляционную сульфитредуктазу (DsrAB), небольшой белок DsrC и мембранный комплекс DsrMK (Pereira *et al.*, 2011)

1.1.1. Транспорт и активация сульфата

Перенос сульфата внутрь клетки у СРП происходит с помощью симпорта – вторичной транспортной системы, которая осуществляет однонаправленный транспорт аниона сульфата и катионов H^+ или Na^+ (Cypionka, 1995). В настоящее время для СРП описано два типа транспортных систем, и то, какой

тип будет использован, зависит от концентрации сульфата. При высоких концентрациях сульфата функционирует конститутивная транспортная система, осуществляющая электронейтральный однонаправленный транспорт аниона сульфата и двух одновалентных катионов. В данном случае энергетических затрат не требуется. При низких концентрациях сульфата происходит образование и активация индуцибельной транспортной системы, которая осуществляет электрогенный однонаправленный транспорт аниона сульфата и сразу 3-х одновалентных катионов, т.е. данный процесс идёт с затратой энергии (Curlionka, 1995). Транспорт сульфата не был детально изучен для СРП, но геномный анализ указывает, что в качестве переносчиков выступают сульфатный транспортер ABC-типа (SulT семейство) и сульфатная пермиаза (SulP семейство), принадлежащие к одному суперсемейству белков (Kertesz, 2001).

Из-за высокой стабильности аниона SO_4^{2-} , его восстановление до HSO_3^- имеет очень низкий окислительно-восстановительный потенциал (-526 мВ) (Thauer *et al.*, 2007), и поэтому на первом этапе происходит энергозависимая активация сульфата, в результате чего образуется аденозинфосфосульфат (АФС) и пирофосфат (PPi):



Данную реакцию катализирует АТФ-сульфурилаза (Sat) – широко распространённый фермент, присутствующий не только в СРП, но также в сероокисляющих прокариотах и во всех организмах восстанавливающих сульфат в ходе ассимиляции, включая растения, водоросли, дрожжи, многие бактерии и археи (Koprivova & Kopriva, 2014; Leustek *et al.*, 2000). Высокий процент сходства по аминокислотной последовательности между АТФ-сульфурилазами из различных организмов, а также высокая консервативность в организации активного центра фермента говорят о появлении данного фермента у общего предка живых организмов ещё до разделения на бактерий, архей и эукариот (Parey *et al.*, 2013a; Parey *et al.*, 2013b).

Так как, активация сульфата – это эндергонический процесс (Thauer *et al.*, 1977), то он может осуществляться за счёт поддержания низких концентраций АФС и PPi, а также за счёт того, что последующие реакции восстановления АФС и гидролиза PPi представляют собой экзергонические процессы (Rabus *et al.*, 2015).

Гидролиз пирофосфата описывается следующим уравнением:



У большинства СРП данную реакцию катализирует растворимая Mg-зависимая пирофосфатаза (Liu & Le Gall, 1990; Ware & Postgate, 1971). Однако некоторые СРП содержат мембраносвязанную протон-транслоцирующую пирофосфатазу (HppA) (Pereira *et al.*, 2011), которая осуществляет запасание энергии при гидролизе пирофосфата (Serrano *et al.*, 2007).

Таким образом, на этапе активации сульфата происходит гидролиз двух макроэргических связей, что эквивалентно затрате сразу двух молекул АТФ.

1.1.2. Восстановление АФС

На следующем этапе происходит двухэлектронное восстановление АФС, в результате чего образуется бисульфит и АМФ. Окислительно-восстановительный потенциал пары АФС / HSO₃⁻ равен -60мВ (Rabus *et al.*, 2015). Суммарное уравнение для данной реакции выглядит следующим образом:

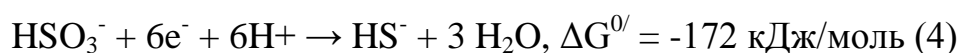


Данную реакцию катализирует АФС-редуктаза (AprAB) – гетеродимерный железо-серный флавопротеин (Lampreia *et al.*, 1994; Parey *et al.*, 2013b). Восстановление АФС до бисульфита и АМФ является экзергоническим процессом, однако образующаяся энергия напрямую не используется для создания электрохимического потенциала, так как АФС-

редуктаза является растворимым ферментом. Физиологическим донором электронов для AprAB является мембранный QmoABC комплекс (Pires *et al.*, 2003), который, по-видимому, и ответственен за сопряжение запасания хемиосмотической энергии на мембране и восстановления АФС в цитоплазме. Мутанты *Desulfovibrio vilgaris* Hildenbiriugh с дефектными генами *qmoABC* не были способны к росту на сульфате, но сохраняли способность к восстановлению сульфита и тиосульфата (Zane *et al.*, 2010). Данный факт является важным доказательством того, что Qmo-комплекс взаимодействует с AprAB и необходим для сульфат-, но не сульфитредукции. Непосредственное взаимодействие AprAB и QmoABC было показано в биохимических исследованиях (Ramos *et al.*, 2012), но механизм запасания энергии до конца не выяснен.

1.1.3. Восстановление сульфита

На завершающем этапе диссимиляционной сульфатредукции происходит шестиэлектронное восстановление бисульфита до сульфида. Окислительно-восстановительный потенциал пары $\text{HSO}_3^- / \text{HS}^-$ равен -116 мВ. Данную реакцию катализирует диссимиляционная сульфитредуктаза (DsrAB), кроме того в этот процесс вовлечён небольшой белок DsrC и мембранный комплекс DsrMKJOP (у некоторых прокариот только DsrMK) (Rabus *et al.*, 2015). Суммарное уравнение для данной реакции выглядит следующим образом:



Диссимиляционная сульфитредуктаза представляет собой гетеродимер, состоящий из двух субъединиц - DsrA и DsrB. Данный фермент содержит характерный кофактор – тетрагидропорфирин с атомом железа в центре (так называемый сирогем), который через цистеиновый остаток соединяется с [4Fe–4S] кластером. DsrAB принадлежит к большому семейству ферментов, включающих также ассимиляционную сульфитредуктазу и нитритредуктазу

(Crane & Getzoff, 1996; Crane *et al.*, 1995; Dhillon *et al.*, 2005; Janick & Siegel, 1982; Moura *et al.*, 1988). При измерении активности диссимиляционной сульфитредуктазы *in vitro* происходит образование смеси сульфида, тритионата и тиосульфата, соотношение которых сильно зависит от условий постановки эксперимента (Peck *et al.*, 1982; Rabus *et al.*, 2007). Данный факт привёл к появлению большого количества споров о механизме восстановления сульфита. В качестве решения данной проблемы был предложен так называемый тритионатный путь (Akagi, 1995), однако, данный механизм не объяснял зависимость между соотношением продуктов реакции и условиями её проведения.

Диссимиляционная сульфитредуктаза является ключевым ферментом для всего цикла серы, так как встречается не только у СРП, но и у микроорганизмов, способных окислять серу, восстанавливать сульфит и тиосульфат, а также диспропорционировать восстановленные серные соединения. Филогения генов *dsrAB* в значительной степени совпадает с филогенией гена 16S рРНК, однако есть и исключения. Данный факт позволяет использовать гены *dsrAB* в качестве филогенетических маркеров при различных экологических исследованиях с применением молекулярно-биологических методов (Dhillon *et al.*, 2003; Hansel *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 1998). С помощью таких исследований был выявлен большой набор ранее неизвестных последовательностей *dsrAB*, что в свою очередь указывает на существование ещё не описанных крупных таксонов СРП (Müller *et al.*, 2015; Pester *et al.*, 2012).

Участие второго ключевого игрока восстановления сульфита – малого белка DsrC, стало очевидным после определения кристаллической структуры комплекса DsrAB-DsrC из *D. vulgaris* (Oliveira *et al.*, 2008). DsrAB из *Desulfovibrio* spp., как правило, выделяется в комплексе с DsrC (Pierik *et al.*, 1992), но в случае с другими видами СРП это правило далеко не всегда соблюдается (Dahl *et al.*, 1993; Molitor *et al.*, 1998). Так, например, с помощью масс-спектрометрических исследований было показано, что DsrAB из *D. vulgaris* и *Desulfomicrobium norvegicum* выделяется в виде смеси DsrAB $\alpha_2\beta_2$

субъединиц, связанных с двумя или одной молекулой DsrC, а иногда вообще без неё (Oliveira *et al.*, 2011). Было показано, что основное количество молекул DsrC внутри клетки находится в свободном состоянии (Venceslau *et al.*, 2013). Вскоре был предложен механизм восстановления сульфита, где на начальном этапе происходит четырёхэлектронное восстановление сульфита с образованием персульфида в качестве промежуточного продукта, который связан с цистеиновым остатком в DsrC (Oliveira *et al.*, 2008). На следующем этапе происходит взаимодействие персульфида со вторым консервативным остатком цистеина внутри этой же молекулы DsrC, в результате чего образуется дисульфидная связь и выделяется H₂S. Дисульфидная связь, в свою очередь, является субстратом для комплекса DsrMKJOP, который передаёт электроны от менахинолового пула, и тем самым восстанавливая исходное состояние DsrC (Oliveira *et al.*, 2008; Venceslau *et al.*, 2014). Однако недавние исследования указывают, что персульфид DsrC не является интермедиатом в этом процессе (Rabus *et al.*, 2015).

Связь между генами *dsrAB* и *dsrMKJOP* была впервые показана для сероокисляющей бактерии *Allochromatium vinosum*, где был обнаружен большой генный кластер *dsr*, который был необходим для окисления внутриклеточных глобул серы (Dahl *et al.*, 2005; Sander *et al.*, 2006). В настоящее время выяснили, что все организмы, которые имеют гены *dsrAB*, имеют также и гены *dsrC* и как минимум *dsrMK* (Venceslau *et al.*, 2014). В сероокисляющих микроорганизмах все перечисленные гены, как правило, связаны в один кластер, что гораздо реже выполняется для СРП (Pereira *et al.*, 2011; Venceslau *et al.*, 2014).

В настоящее время предложен новый механизм восстановления сульфита, в котором уже не принимается во внимание участие DsrC. Предполагается, что шестиэлектронное восстановление сульфита происходит через три последовательных этапа двухэлектронного восстановления (Parey *et al.*, 2010). Образующиеся в результате этого интермедиаты могут реагировать с сульфитом, образуя при этом тритионат и тиосульфат, что объясняет их

образование в качестве побочных продуктов, особенно *in vitro*, когда концентрации сульфита очень высоки (Venceslau *et al.*, 2014). В настоящее время по-прежнему нет окончательного ответа на вопрос о физиологическом доноре электронов для восстановления сульфита, однако основным претендентом на эту роль является мембранный комплекс DsrMKJOP.

1.1.4. Мембранные комплексы, необходимые для осуществления сульфатредукции

Давно известно, что процесс восстановления сульфата сопряжен с окислительным фосфорилированием, в ходе которого происходит синтез АТФ за счёт электрохимического потенциала, образующегося при функционировании ЭТЦ (Cypionka, 1995; Grein *et al.*, 2013; Thauer *et al.*, 2007). На начальных этапах была предложена общая схема окислительного фосфорилирования (Lupton *et al.*, 1984; Wood, 1978), но довольно быстро были получены и первые экспериментальные подтверждения данного процесса. В частности, на представителях рода *Desulfovibrio* было продемонстрировано сопряжение транспорта электронов и переноса протонов через мембрану (Fitz & Cypionka, 1989, 1991; Kobayashi *et al.*, 1982).

В то же время существенно недооценивалась роль хинонов в транспорте электронов, так как считалось, что значение окислительно-восстановительного потенциала для менахинола ($E^{0'} = -75$ мВ) является недостаточно низким для восстановления APS до сульфита ($E^{0'} = -60$ мВ) или же сульфита до сульфида ($E^{0'} = -116$ мВ) (Rabus *et al.*, 2015). Основной же проблемой в понимании механизма сульфатредукции в течение длительного времени было отсутствие каких-либо знаний о мембранных комплексах, являющихся физиологическими донорами электронов для AprAB и DsrAB. Всё изменилось после открытия двух мембранных комплексов, QmoABC (Pires *et al.*, 2003) и DsrMKJOP (Mander *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2006), которые, скорее всего, вовлечены в

транспорт электронов на AprAB и DsrAB/DsrC (Grein *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2012).

Хинон-взаимодействующий мембраносвязанный оксидоредуктазный комплекс (QmoABC) был впервые описан для *D. desulfuricans* ATCC27774, где также впервые и была предложена функция донора электронов для AprAB (Pires *et al.*, 2003). Комплекс состоит из двух растворимых цитоплазматических субъединиц (QmoA и QmoB) и одной мембраносвязанной субъединицы (QmoC). Гены *qmo* консервативны для всех известных СРП и, как правило, расположены в едином генном кластере *sat–aprBA–qmoABC* (Pereira *et al.*, 2011). Дефектный по генам *qmoABC* мутантный штамм *D. vulgaris* не рос на сульфате в качестве терминального акцептора электронов, но сохранял способность роста на сульфите и тиосульфате, что в свою очередь является доказательством участия данного комплекса в восстановление AprAB (Zane *et al.*, 2010). Во многих СРП относящихся к *Clostridia* отсутствует ген *qmoC*. Предполагается, что в этих микроорганизмах функционирует растворимый комплекс QmoAB. Более того в данных СРП в непосредственной близости от генов *qmoAB* было найдены гены *hdrBC*, что может указывать на получение электронов из различных метаболических путей не связанных с мембраной (Junier *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2011). Таким образом, предполагается, что у сульфатредуцирующих представителей класса *Clostridia* процесс восстановления аденозинфосфосульфата не связан с генерацией электрохимического потенциала (Rabus *et al.*, 2015).

Все субъединицы комплекса Qmo гомологичны субъединицам гетеродисульфидредуктазы (Hdr) (Grein *et al.*, 2013) – фермента, ответственного за восстановление гетеродисульфида у метаногенов (Hedderich *et al.*, 2005; Thauer *et al.*, 2008). И QmoA и QmoB представляют собой флавопротеины, содержащие в качестве кофермента FAD. Обе субъединицы гомологичны субъединице HdrA из комплекса HdrABC гидрогенотрофных метаногенов. QmoB более крупный белок, чем Qmo A, и содержит два FAD-связывающих и два $[4Fe-4S]^{2+/1+}$ центра. Кроме того, в состав QmoB входит домен

гомологичный субъединицы MvhD из метаногенной гидрогеназы MvhADG, которая образует комплекс с HdrABC. MvhD содержит два $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+/1+}$ центра, ответственных за транспорт электронов на HdrA (Stojanowic *et al.*, 2003). QmoC содержит два гемма *b* в трансмембранном домене и два $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+/1+}$ центра в растворимом цитоплазматическом домене. Гидрофобный трансмембранный домен гомологичен субъединице HdrE комплекса HdrED из метилотрофных архей (Derpenmeier, 2004), в то время как растворимый домен гомологичен электронтранспортирующей субъединице HdrC. По этой причине предполагается, что QmoC возник в результате объединения двух генов. Считается, что аналоги менахинола передают электроны на QmoC, далее на QmoAB, после чего уже идёт восстановление APS (Pires *et al.*, 2003). Экспериментально было показано прямое взаимодействие между QmoABC и AprAB (Krumholz *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2012), но транспорт электронов между этими компонентами не был обнаружен (Ramos *et al.*, 2012), что вероятно связано с вовлечением в этот процесс других белков.

Недавно было показано, что HdrABC и MvhADG образуют комплекс, в результате чего происходит сопряжение двух реакций – восстановление гетеродисульфида за счёт H_2 и восстановление ферредоксина через механизм флавин-основанной электронной бифуркации, где субъединица HdrA содержит флавиновый кофактор и ответственна за бифуркацию (Kaster *et al.*, 2011). По аналогии с данным механизмом было высказано предположение, что электронный транспорт между менахинолом и APS требует участие низкопотенциальных электронов (предположительно их источником является ферредоксин) в процессе электронной конфуркации (процесс, обратный бифуркации). Предполагается, что данный механизм может обеспечить восстановление APS, несмотря на небольшую разницу между потенциалами менахинола ($E^{0'} = -75$ мВ) и APS ($E^{0'} (\text{APS}/\text{SO}_3^{2-}) = -60$ мВ) (Ramos *et al.*, 2012).

Комплекс DsrMKJOP. является вторым мембранным комплексом, присутствующим в СРП (Grein *et al.*, 2013; Mander *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2011; Pires *et al.*, 2006). Предполагается, что комплекс состоит из двух модулей

– строго консервативный для всех СРП модуля DsrMK и отсутствующего у Грам-положительных бактерий модуля DsrJOP (Pereira *et al.*, 2011; Venceslau *et al.*, 2014). Рассмотрим подробнее первый модуль. Модуль DsrMK гомологичен HdrED из метилотрофных метаногенов. Субъединица DsrK представляет собой Fe–S цитоплазматический белок (Pereira *et al.*, 2011; Venceslau *et al.*, 2014), который гомологичен каталитической субъединице HdrD, отвечающей за восстановление гетеродисульфида (Hedderich *et al.*, 2005). Субъединица DsrM, гомологичная субъединице Hdr E, является мембраносвязанным белком и содержит дигемовый цитохром *b* (Pereira *et al.*, 2011; Venceslau *et al.*, 2014). Модуль DsrMK участвует в транспорте электронов от менахинолового пула на соединение, содержащую дисульфидную связь, в качестве которого, по-видимому, выступает малый белок DsrC (Oliveira *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2011). Недавно было продемонстрировано прямое взаимодействие между DsrM и DsrK (Grein *et al.*, 2010).

Роль модуля DsrJOP до конца не ясна, но предполагается, что он вовлечен в транспорт электронов между периплазмой и хиноновым пулом, тем самым возможно существование менахинол/менахинонового цикла между DsrMK и DsrJOP (Grein *et al.*, 2013). Важно отметить, что в восстановлении DsrC за счёт менахинола может иметь место конфурация, которая была рассмотрена выше для Qmo/Apr (Ramos *et al.*, 2012).

В СРП были обнаружены и другие трансмембранные комплексы, участвующие в генерации электрохимического потенциала, но они не являются строго обязательными для осуществления процесса сульфатредукции.

1.2. Разнообразии СРП

В настоящее время способность к диссимиляционной сульфатредукции показана как для представителей домена *Bacteria*, так и для представителей домена *Archaea* (Muzyer & Stams, 2008). Большинство сульфатредуцирующих микроорганизмов относится к классу *Deltaproteobacteria* (порядки

Desulfovibrionales, *Desulfobacterales*, *Desulfarculales* и *Syntrophobacterales*). На втором месте по видовому разнообразию сульфатредуцирующих микроорганизмов расположились два класса *Firmicutes* - *Negativicutes* и *Clostridia* (включая представителей семейств *Peptococcaceae*, *Thermoanaerobacteraceae* и *Thermodesulfobiaceae*). Третьей филогенетической линией является класс *Thermodesulfobacteria*, который включает в себя два рода сульфатредуцирующих микроорганизмов - *Thermodesulfobacterium* и *Thermodesulfatator*. И наконец, четвёртой бактериальной ветвью, представители которой способны к восстановлению сульфатов, является класс *Nitrospira* (род *Thermodesulfovibrio*) (Muyzer & Stams, 2008).

Среди домена *Archaea* способность к сульфатредукции показана для представителей рода *Archaeoglobus*, относящегося к типу *Euryarchaeota* (Klenk *et al.*, 1997). Однако, как было отмечено ранее, гены сульфатредукции у представителей рода *Archaeoglobus* были получены путём горизонтального переноса от бактерий (Friedrich, 2002; Klein *et al.*, 2001; Larsen *et al.*, 1999; Meyer & Kuever, 2007b). Для двух других архей – *C. maquilingensis* (Itoh *et al.*, 1999) и *T. tenax* (Siebers *et al.*, 2011), уже относящихся к типу *Crenarchaeota*, в литературе упоминается способность к росту на среде с сульфатом, однако, каких-либо экспериментальных доказательств не приводится. Важно отметить, что у *C. maquilingensis* и *T. tenax* отсутствуют гены *qmo*, которые обнаружены у всех остальных СРП (Pires *et al.*, 2003; Zane *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2011). По этой причине рассмотрение данных организмов как СРП является предварительным, до тех пор, пока способность к диссимиляционной сульфатредукции не будет доказана экспериментально. Интересно, что анализ геномов представителей рода *Pyrobaculum* (*Pyrobaculum aerophilum*, *Pyrobaculum oguniense*, *Pyrobaculum arsenaticum*, *Pyrobaculum calidifontis*, *Pyrobaculum* sp. 1860), являющихся серо- и тиосульфатредуцирующими представителями типа *Crenarchaeota*, показал, что данные организмы содержат почти полный набор генов, необходимых для сульфатредукции (*sat*, *aprBA*, *dsrABCMK*) за исключением генов *qmo* (Rabus *et al.*, 2015). Это позволяет

предположить, что представители родов *Caldivirga*, *Thermoproteus* и *Pyrobaculum* способны к дыханию на тиосульфате и сульфите, но не на сульфате (Rabus *et al.*, 2015).

1.3. Эволюция СРП

Эволюция СРП была исследована благодаря филогенетическому анализу некоторых ключевых генов диссимиляционной сульфатредукции. Филогенетический анализ был проведён для генов *sat* (Boucher *et al.*, 2003; Sperling *et al.*, 1998), *aprAB* (Boucher *et al.*, 2003; Friedrich, 2002; Hipp *et al.*, 1997; Meyer & Kuever, 2007a, 2007b) и *dsrAB* (Boucher *et al.*, 2003; Klein *et al.*, 2001; Wagner, 1998; Loy *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2015; Larsen *et al.*, 1999). Как правило, полученные результаты свидетельствуют о вертикальном наследовании генов, но имеются и несколько примеров горизонтального переноса. Например, гены *aprAB* подвергались горизонтальному переносу в *Archaeoglobus*, *Syntrophobacterales*, *Thermodesulfobacterium*, *Thermodesulfovibrio* и некоторые линии класса *Deltaproteobacteria* (Friedrich, 2002; Meyer & Kuever, 2007b). Горизонтальное наследование генов *dsrAB* было описано для *Archaeoglobus* (Larsen *et al.*, 1999), *Thermodesulfobacterium* и некоторых представителей филума *Firmicutes* (*Desulfotomaculum* spp., *Moorella thermoacetica* и *Ammonifex degensii*), которые получили данные гены от представителей класса *Deltaproteobacteria* (Klein *et al.*, 2001; Zverlov *et al.*, 2005). Присутствие генов *dsrAB* бактериального происхождения в представителях рода *Archaeoglobus* указывают на междоменный перенос генов. В противовес этому, гены *dsrAB* из *Pyrobaculum*, *Caldivirga* и *Thermoproteus* образуют глубокую филогенетическую ветвь, отдалённую от бактериальной формы *dsrAB* (Blank, 2012; Hipp *et al.*, 1997; Loy *et al.*, 2009; Molitor *et al.*, 1998). Анализ геномных фрагментов из некультивируемых морских микроорганизмов, содержащих полный набор генов сульфатредукции, позволил предположить их совместное наследование (Klein *et al.*, 2001; Musmann *et al.*, 2005). Также

имеются примеры независимого переноса генов *aprAB* и *dsrAB*, однако, данное явление является большой редкостью (Meyer & Kuever, 2007b).

В настоящее время существует дискуссия по поводу времени появления микробной сульфатредукции. Начало дискуссии было положено после публикации Shen с соавторами, где сообщалось о фракционировании изотопов серы в барите возрастом 3.5 млрд. лет, обнаруженном на северо-западе Австралии. На основании данного факта было сделано предположение о возможном появлении СРП уже в раннем Архее (Shen & Buick, 2004; Shen *et al.*, 2001). В то же время существует и альтернативная точка зрения, согласно которой фракционирование изотопов серы могло быть осуществлено в результате физико-химических превращений серы (Philippot *et al.*, 2007). Последнему утверждению противопоставляются находки микрофоссилий возрастом 3.4 млрд. лет (Wacey *et al.*, 2011; 2010), а также опубликованы результаты исследования, в котором были обнаружены строматолиты возрастом 3.7 млрд. лет (Nutman *et al.*, 2016). Тем не менее, в настоящее время не представляется возможным доказать, что фракционирование изотопов серы в минералах связано именно с деятельностью СРП, так как за данный процесс могут отвечать также микроорганизмы, восстанавливающие сульфит и тиосульфат и диспропорционирующие восстановленные серные соединения (Farquhar *et al.*, 2013; Johnston, 2011; Philippot *et al.*, 2007). Тем не менее, с учётом тесной филогенетической связи между СРП и микроорганизмами диспропорционирующих серные соединения, которые к тому же образуют сульфат в качестве конечного продукта, можно предположить, что эти два процесса сосуществовали одновременно (Finster, 2008). Неоспоримые доказательства существования сульфатредукции датируются 2.4 млрд. лет, когда в атмосфере появился свободный кислород и океан наполнился сульфатами (Canfield *et al.*, 2000; Farquhar *et al.*, 2000; Habicht *et al.*, 2002). В протерозое сульфатредукция стала доминирующим биологическим процессом в океане. Есть гипотеза, согласно которой мезофильные СРП появились и начали развиваться только после увеличения уровня кислорода в атмосфере, а

сульфатредукция присутствовала у рано отделившихся глубоких филогенетических линий термофильных СРП (Blank, 2004; 2009; Rabus *et al.*, 2015). Предполагается, что первые организмы, способные использовать серные соединения, были представлены видами, восстанавливающими и диспропорционирующими серу, сульфит и тиосульфат. Это связано с тем, что и сера и сульфит в большом количестве присутствовали на поверхности ранней Земли, образуясь из вулканического и гидротермального SO₂ (Rabus *et al.*, 2015). Более раннее появление сульфитредукторов также согласуется с большей распространённостью диссимиляционной сульфитредукции среди разных филогенетических линий прокариот по сравнению с сульфатредукцией, и тем, что фермент DsrAB имеет древнее происхождение (Dhillon *et al.*, 2005; Molitor *et al.*, 1998). Кроме того, сульфитредукция напрямую сопряжена с получением энергии, в то время как в процессе сульфатредукции на начальной стадии идёт активация сульфата, сопровождающийся затратой энергии и требующий дополнительных ферментативных комплексов, что говорит о более сложной организации данного процесса.

Так или иначе, версия раннего появления СРП не может быть отброшена, так как сульфат мог присутствовать на ранних этапах развития жизни. Образование сульфата могло идти или химическим путём, в результате фотолиза SO₂, или же биологическим, в результате жизнедеятельности микроорганизмов диспропорционирующих сульфит или серу. Скорее всего, первые СРП жили в условиях низких концентраций сульфата, и их вклад в глобальный цикл серы не был существенным (Canfield *et al.*, 2000; Habicht *et al.*, 2002; Jamieson *et al.*, 2013), что является основной причиной сложности обнаружения неоспоримых доказательств сульфатредукции в раннем Архее (Farquhar *et al.*, 2013).

1.4. Экология СРП

СРП были обнаружены в самых разнообразных анаэробных местообитаниях, к которым относятся осадки и толща вод морей, океанов и

пресноводных водоёмов, глубоководные гидротермальные выходы, вулканические фумаролы, рисовые поля, болотистые местности, почвы, содовые озёра, кислые карьерные озёра, дренажи кислых стоков рудников и шахт, хвостохранилища, сточные воды, месторождения нефти и газа и т.д. СРП приспособились к самым разнообразным условиям, а также к жизни в экстремальных местообитаниях. (Brune *et al.*, 2000; Hoehler & Jorgensen, 2013; Holmer & Storkholm, 2001; Muyzer & Stams, 2008; Orcutt *et al.*, 2011; Pester *et al.*, 2012; Rabus *et al.*, 2015). В связи с тем, что по экологии СРП накоплено огромное количество информации, а данная работа посвящена термоацидофильным сульфатредуцирующим микроорганизмам, сконцентрируем наше внимание на результатах исследований сульфатредукции в кислых и термальных местообитаниях.

1.4.1. Сульфатредукция в кислых местообитаниях

В течение длительного времени вопрос о возможности протекания процесса микробной сульфатредукции в кислых местообитаниях оставался нерешённым. Считалось, что СРП предпочитают местообитания с нейтральными значениями pH (Widdel, 1988; Hao *et al.*, 1996), что объяснялось наличием чистых культур СРП, оптимально растущих в интервале pH между 6 и 8 (Badziong & Thauer, 1978; Johnson, 1998). Наличие первых положительных результатов по измерению интенсивности сульфатредукции в кислых местообитаниях объяснялось образованием микрониш с более высоким значением pH (Widdel, 1988; Hao *et al.*, 1996), однако, данный тезис был опровергнут (Koschorreck, 2008). Основным направлением исследований ацидофильной сульфатредукции является выявлением агентов данного процесса, что в первую очередь связано с дальнейшей возможностью использовать данные микроорганизмы в биологической нейтрализации дренажных сточных вод рудников (Lens & Kuenen, 2001; Johnson *et al.*, 2004; Kaksonen & Puhakka, 2007).

1.4.1.1. Факторы, оказывающие влияние на СРП при низких значениях pH

С точки зрения термодинамики, при низких значениях pH сульфатредукция даёт больший энергетический выход, чем при нейтральных условиях. Рассмотрим для примера следующую реакцию:



Термодинамический расчёт показывает, что при pH 3.0 значение ΔG^0 равно -198 кДж/моль, в то время как при pH 7.0 составляет -152 кДж/моль (Koschorreck, 2008). Интересно, что помимо большего энергетического выхода, для ацидофильных СРП характерна и более высокая интенсивность самого процесса, о чём сообщается в опубликованной в 2012 году статье Meier с соавторами, где уровень клеточной сульфатредукции для ацидофильных СРП варьировал в интервале 88-417 фмоль SO_4 /клетка·сутки. В то время как для чистых культур нейтрофильных СРП данная величина изменялась в интервале 0.16-150 фмоль SO_4 /клетка·сутки (Jorgensen, 1978; и ссылки в этой статье; Brüchert *et al.*, 2001; Kleikemper *et al.*, 2004). Однако, относительно высокий уровень клеточной сульфатредукции для ацидофильных СРП сочетался с низким приростом биомассы, что, вероятно, связано с большими энергетическими затратами на поддержание внутриклеточного pH (Meier *et al.*, 2012; Martin, 1990; Lowe *et al.*, 1993). Это необходимая плата организмов за жизнь в кислых условиях, так как при низких значениях pH происходит дестабилизация белковых молекул, что может приводить к их последующей денатурации (Fink *et al.*, 1994). Таким образом, микроорганизмы с низкой метаболической продукцией энергии, такие как СРП (Hamilton, 1998) особенно чувствительны к низким значениям pH. Более того, метаболические продукты жизнедеятельности анаэробных организмов - сульфид и органические кислоты - токсичны при низких значениях pH (Koschorreck, 2008).

Токсичность сульфида. Свободный сульфид токсичен для всех живых организмов, так как он взаимодействует с ионами металлов и

функциональными группами компонентов электрон транспортных цепей, аминокислотами и коферментами (Hao *et al.*, 1996). Сульфид может негативно влиять на рост микроорганизмов, осажая в виде сульфидов необходимые металлы, входящие в состав микроэлементов. В сравнение с другими прокариотами для сульфидогенов, в том числе и СРП, проблема токсичности сульфида стоит наиболее остро, так как данное соединение является основным конечным продуктом метаболизма. Следует отметить, что, нахождение сульфида в растворе в той или иной форме зависит от величины рН. При значениях рН ниже 5.0 сульфид присутствует исключительно в виде недиссоциированной формы H_2S (Koschorreck, 2008). В целом ряде исследований было показано, что H_2S является наиболее токсичной формой, что объясняется большей проницаемостью через мембрану электронейтральной молекулы (Oleszkiewicz *et al.*, 1989; O'Flaherty *et al.*, 1998; Moosa & Harrison, 2006).

Отличия в чувствительности разных микроорганизмов к сульфиду может оказывать влияние на конкурентные отношения между ними. Так, например, в ряде исследованиях было показано, что метаногены были менее чувствительны к H_2S , чем СРП (Maillacheruvu & Parkin, 1996; Visser *et al.*, 1996; O'Flaherty *et al.*, 1998), а в анаэробных реакторах с повышением концентрации H_2S был зафиксирован переход от сульфатредукции к метаногенезу (McCartney & Oleszkiewicz, 1991). Однако данные результаты не столь однозначны и в литературе также приводятся сведения об обратной ситуации, когда метаногены были более чувствительны к сульфиду, чем СРП (Omil *et al.*, 1996; Yamaguchi *et al.*, 1999).

Показано, что 50% ингибирование сульфатредукции происходит при концентрации сульфида между 2 и 15 мМ, однако данные результаты были получены в опытах с культурами, растущими при нейтральных значениях рН, и могут быть не корректны для кислых условий роста (Koschorreck, 2008). Так или иначе, концентрация сульфида в естественных местообитаниях значительно ниже упомянутых цифр (Koschorreck, 2008). Например, в осадках

вулканического озера Lake Caviahue в Аргентине с pH 3.0 была обнаружена сульфатредукция в присутствии 0.7 мМ H₂S (Koschorreck *et al.*, 2003). Активность СРП была показана и в осадках карьерного озера Grünwalder Lauch с концентрацией сульфида 0.2 мМ (Koschorreck *et al.*, 2007). Активная сульфатредукция была также измерена при pH 3.0 в толще воды карьерного озера с концентрацией сульфида <1 мМ (Gyure *et al.*, 1987). Столь низкие концентрации сульфида в кислых местообитаниях объясняются его химическим взаимодействием с железом и другими металлами, в результате чего образовавшиеся сульфиды металлов выпадают в осадок (Holmer & Storkholm, 2001). Исходя из выше сказанного, можно сделать вывод о том, что присутствие тяжёлых металлов в кислых местообитаниях является важным условием для протекания процесса диссимиляционной сульфатредукции при низких значениях pH (Bharathi *et al.*, 1990; Colleran *et al.*, 1995). Высокие же значения концентрации сульфида в среде могут быть достигнуты в ходе периодического культивирования в лабораторных условиях, что в свою очередь является одной из причин трудности получения чистых культур ацидофильных СРП. Таким образом, ингибирование сульфатредукции в кислых местообитаниях не может быть объяснено исключительно влиянием H₂S (Koschorreck, 2008).

Влияние высоких концентраций растворённых металлов и металлоидов. Для кислых вод характерен целый ряд особенностей, к которым относятся отсутствие соединений гидрокарбонатов и карбонатов, присутствие свободных неорганических кислот, нестабильность тиосульфата и полиитионатов с последующей диссоциацией этих соединений и образованием элементной серы, а также специфический компонентный состав, обусловленный, как правило, высоким содержанием растворённых металлов и металлоидов. Высокая концентрация металлов и металлоидов объясняется окислением сульфидных минералов, главным образом пирита, а так же более высокой растворимостью тяжёлых металлов в кислых условиях. При первичном окислении сульфидных минералов происходит высвобождение

сульфата и катионов металлов (например, $\text{Fe}^{2+/3+}$, Zn^{2+} , Cu^{2+}) (Nordstrom & Alpers, 1999; Blodau, 2006). Вторичные процессы, такие как растворение карбонатов и силикатов, приводят к увеличению концентрации Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} и Al^{3+} (Meier *et al.*, 2012). Так, например, в антропогенных кислых озёрах со значением pH между 2 и 3, образованных в результате затопления карьеров по добычи руды, концентрации сульфата и ионов металлов достигают миллимолярных концентраций (Friese *et al.*, 1998; Herzsprung *et al.*, 1998; Peine *et al.*, 2000).

Высокие концентрации металлов и металлоидов с одной стороны положительно влияют на СРП, связывая сульфид, но с другой стороны образующиеся сульфиды металлов могут оказывать ингибирующий эффект на интенсивность сульфатредукции. Дело в том, что СРП часто оказываются замурованы в метал-сульфидном матриксе (Fortin *et al.*, 1996; Herbert Jr *et al.*, 1998; Labrenz & Banfield, 2004; Jong & Parry, 2006). Нерастворимые сульфиды металлов в свою очередь препятствуют поступлению субстратов к клетке, что в результате и приводит к ингибированию активности СРП (Utgikar *et al.*, 2002).

Ингибирование органическими кислотами. При низких значениях pH, карбоксильные группы существуют главным образом в недиссоциированной форме. Незаряженные молекулы оказывают ингибирующее действия на микроорганизмы ввиду, того что они могут беспрепятственно встраиваться в мембрану клеток и выступать в роли разобщителей дыхания (Ghose & Wikgen, 1955). Клетки *Clostridium thermoaceticum* перестают расти, когда концентрация недиссоциированного ацетата достигает 45 мМ, а при $\text{pH} < 5.0$ электрохимический трансмембранный потенциал исчезает (Baronofsky *et al.*, 1984). Хорошо известен факт перестройки углеводного метаболизма у анаэробных бактерий при низких значениях pH для того чтобы избежать накопления токсических концентраций органических кислот (Benner *et al.*, 1999). Так, например, в процессе сбраживания глюкозы при понижении pH среды вместо ацетата и H_2 начинает образовываться этанол.

Для биореакторов было показано, что активность СРП уменьшается пропорционально возрастанию концентрации недиссоциированных органических кислот (Jong & Parry, 2006). Так же имеются сведения о том, что в интервале рН между 5.8 и 7.0 наблюдается 50% ингибирование активности смешанной культуры СРП при концентрации недиссоциированной уксусной кислоты 0.9 мМ, что при рН 6.2 соответствует 25 мМ общей концентрации ацетата (Reis *et al.*, 1990). Как и в случае с H_2S , различная чувствительность организмов к концентрации недиссоциированных органических кислот может оказывать влияние на конкурентные отношения между различными прокариотами. СРП, как правило, более чувствительны к возрастанию концентрации летучих жирных кислот, чем метаногены (James *et al.*, 1998).

Но, так же как и в случае с сульфидом, концентрации органических кислот необходимые для ингибирования роста СРП значительно выше реальных концентраций органических кислот в кислых местообитаниях (Koschorreck, 2008). Например, концентрация ацетата в осадках кислых карьерных озёр обычно ниже 10 мкМ, в то время как концентрация ацетата в осадках вулканического озера Lake Caviahuе была не более чем 380 мкМ (Koschorreck *et al.*, 2003). Таким образом, ингибирование органическими кислотами может иметь место в биореакторах и лабораторных культурах, но не естественных и антропогенных местообитаниях (Koschorreck, 2008).

Конкурентные отношения между СРП и микроорганизмами других физиологических групп. В кислых местообитаниях те или иные физиологические группы могут получать преимущества в конкурентной борьбе за различные субстраты. СРП могут конкурировать с микроорганизмами, осуществляющими процессы метаногенеза, ацетогенеза, брожения, денитрификации, восстановления железа (Baeseman *et al.*, 2006; Colleran *et al.*, 1995; Stams *et al.*, 2005). Кислые источники зачастую одновременно содержат высокие концентрации сульфата и растворённого железа, и в то же время могут быть лимитированы по содержанию органического углерода. В этих условиях, выход энергии в ходе процесса железоредукции схож с выходом энергии в ходе

сульфатного дыхания (Blodau & Peiffer, 2003), что зачастую приводит к конкурентной борьбе между СРП и железоредуцирующими микроорганизмами в кислых экосистемах. В осадках кислых карьерных озёр доминирует процесс железоредукции, в то время как СРП могут быть вытеснены в ходе конкурентной борьбы (Blodau, 2006). В то же время, СРП получают преимущество по сравнению с микроорганизмами, сбрасывающими различные органические субстраты при низких значениях pH (Koschorreck, 2008). Для кислых геотермальных источников характерно высокое содержание серы, что в свою очередь обуславливает конкурентные отношения СРП и серовосстанавливающих организмов, однако литературных данных по взаимодействию данных физиологических групп в настоящее время нет.

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод о том, что ингибирующее влияние сульфида и органических кислот имеет большое значение при культивировании СРП в биореакторах и при работе с лабораторными культурами, где концентрации данных соединений достигают больших значений. В естественных местообитаниях данный фактор не оказывает существенного влияния, а на первый план выходят конкурентные отношения с микроорганизмами других физиологических групп (Koschorreck, 2008).

1.4.1.2. Интенсивность сульфатредукции в кислых местообитаниях

Поиск ацидофильной сульфатредукции был сфокусирован, прежде всего, на местообитаниях с мезофильными условиями - кислых озёрах и реках (естественного и антропогенного происхождения), болотистых местностях, кислых почвах, кислых шахтных водах, хвостохранилищах, биореакторах. Со временем было получено большое количество данных по активности СРП в кислых местообитаниях (Табл. 1.)

Кислые озёра и реки. Наибольшее количество измерений интенсивности сульфатредукции было проведено в осадках карьерных озёр, имеющих

антропогенное происхождение и образовавшихся в процессе затопления отработанных карьеров по добычи тяжёлых металлов. В осадках кислых карьерных озёр была зафиксирована высокая активность СРП, наибольшее значение которой было детектировано в летний период, когда концентрация кислорода в озёрах существенно снижалась. Следует отметить, что в большинстве случаев рН осадков было значительно выше рН воды и фактически сульфатредукция происходила в условиях близких к нейтральным. Так, например, в осадках озера Lake 77 (рН воды около 3.0) сульфатредукция была обнаружена только в осадочных слоях с рН>4.7 (Küsel & Dorsch, 2000; Peine *et al.*, 2000), но не в поверхностном слое с рН<4.1 (Küsel *et al.*, 2001) (Табл. 1). Наибольшая активность СРП в кислых карьерных озёрах была зафиксирована в Lake Grünewalder Lauch (Koschorreck *et al.*, 2007). В этом озере осадки были покрыты сантиметровым слоем водорослей. Эти водоросли выступали в качестве барьера между осадком с рН 6.0 и кислой водой с рН 3.1. Аналогичная ситуация наблюдалась и в озере ML111, в то время как в расположенном неподалёку кислом карьерном озере ML107 с рН воды 2.3 и низкими значениями рН осадков сульфатредукция не была детектирована (Meier *et al.*, 2004) (Табл. 1). Факт более высоких значений рН в осадках послужил причиной того, что многие СРП, изолированные из кислых рек и озёр, оказывались нейтрофилами и не росли при рН<5.0 (Kusel *et al.*, 2001; Tuttle *et al.*, 1969; Lee *et al.*, 2009).

В кислом карьерном озере Reservoir 29 была показана высокая активность СРП при рН ниже 3.0 (Gyure *et al.*, 1990), где значение рН поровой воды в подповерхностном слое песчаника было около 4.0 (Ulrich *et al.*, 1998). Высокий уровень сульфатредукции был обнаружен и в вулканическом озере Caviahue (Аргентина) с рН<3.0, где осадки содержали большое количество органического вещества. Более того, активность железоредуцирующих бактерий, являющихся конкурентами СРП, была, вероятно, ингибирована ввиду низкой доступности железа в вулканических осадках. Кроме того низкие значения рН не позволяли развиваться и метаногенам (Koschorreck *et al.*, 2003).

Заболоченная местность. В данном типе местности причиной низких значений рН является высокая концентрация органических кислот. Другой особенностью вод и почв из заболоченных местностей является низкое содержание сульфатов. Эти два фактора делают болота не очень привлекательными для СРП. Но, несмотря на это, уже в середине 20-го века были получены накопительные культуры сульфатредуцирующих микроорганизмов, растущих на лактате при рН 4.6 (Benda, 1957). На двух торфяных болотах в Чехии (рН<3.4) был измерена интенсивность сульфатредукции в 40 нмоль $SO_4 / (m^2 \cdot \text{сутки})$ (Vile *et al.*, 2003). Сульфатредукция была обнаружена и в профиле заболоченных почв, где в периодически насыщаемых кислородом верхних слоях были обнаружены кислородостойчивые СРП, в то время как в нижних аноксигенных слоях важную роль играли уже синтрофные микроорганизмы (Schmalenberger *et al.*, 2007). Сульфатредукция была также детектирована в нейтральных отложениях дренажных каналов со значением рН воды менее 4.5 (Smith & Melville, 2004).

Хвостохранилища. В течение долгого времени хвостохранилища не рассматривались как место обитания для СРП, что объяснялось не только экстремально низкими значениями рН, но и низким содержанием органических веществ и, как правило, присутствием кислорода. Несмотря на это, довольно большие популяции СРП были детектированы в ряде хвостохранилищ, образовавшихся при добыче Cu и Zn (Fortin & Praharaaj, 2005). При этом, развитие СРП происходило как в оксигенных, так и в аноксигенных условиях. Важно отметить, что, несмотря на детекцию СРП в хвостохранилищах, их активность обнаружить не удавалось (Fortin *et al.*, 1995; 1996; 2000; 2002; 9-13). Первая работа, в которой были показаны высокая интенсивность сульфатредукции (см. табл. 1) была опубликована в 2004 году (Praharaaj & Fortin, 2004). В последующем был проведён ряд измерений и в промышленных районах по добычи меди (Karnachuk *et al.*, 2005).

Табл.1. Скорость сульфатредукции в различных типах кислых местообитаний

Название источника	Тип источника	Место-положение	Тем-ра, °С	рН		Конц. SO ₄ ²⁻ , мМ	Скорость сульфатредукции		Ссылка
				Вода	Осадки		нмоль SO ₄ / (см ³ ·сут)	нмоль SO ₄ / (м ² ·сут)	
Reservoir 29	Карьерное озеро	Германия	10-12	2.7	3.8	10-15	16-152		Gyure <i>et al.</i> , 1990
Lake B	Карьерное озеро	Германия	10-12	3.2	>6	5-15	12-136		Gyure <i>et al.</i> , 1990
ML116	Карьерное озеро	Германия	7-12	3	>6	2-6	17-130	1.2-5.2	Blodau <i>et al.</i> , 1998
ML 76	Карьерное озеро	Германия	7-12	2.8	>6	12-14	70		Blodau <i>et al.</i> , 2000
ML 77	Карьерное озеро	Германия	7-12	3	>5	10-30	6		Peine <i>et al.</i> , 2000
ML111	Карьерное озеро	Германия	5.5	2.6	>4	13.65	1.6-7.2		Meier <i>et al.</i> , 2004
ML Grünwalder Lauch	Карьерное озеро	Германия	10-12	3.1	6	2.9	57-265		Koschorreck <i>et al.</i> , 2003
Lake Caviahue	Вулканическое озеро	Аргентина	4.5	2.6	3	0.4-4.2	33		Koschorreck <i>et al.</i> , 2007
Lake Anna	Озеро с втекающим отводом кислых шахтовых вод	США, Виржиния	Сезонные колебания	4		0.1-4.25	1-443		Herlihy <i>et al.</i> , 1987
Gerritsfles	Торфяное болото	Нидерланды	8	4.4	6	<0.12	5-45	2	Marnette <i>et al.</i> , 1992
Cervene Blato	Торфяное болото	Чехия	4.8		<3.4	4.3	180	40	Vile <i>et al.</i> , 2003
Ocean bog	Торфяное болото	Чехия	4.8		<3.4	8.6	180	40	Vile <i>et al.</i> , 2003
McDonalds Branch	Торфяное болото	США, Нью-Джерси	Сезонные колебания		3.2-4.5	0.27-5.5	1-173.4		Spratt <i>et al.</i> , 1987
Big Run Bog	Торфяное болото	США, Виржиния	4		4-5	0.1-2		9-34	Wieder & Lang, 1988
Schlöppner-brunnen II	Торфяное болото	Германия	14		4-5	0.02-0.24	26.2		Pester <i>et al.</i> , 2010
Potter site	Хвостохранилище	Канада	Сезонные колебания		2-6	12-51	500-1000		Praharaj & Fortin, 2004
Kidd Creek site	Хвостохранилище	Канада		2.1-3.6	0-600	105-135		Praharaj & Fortin, 2004	
Kamkotia site	Хвостохранилище	Канада		2-3	80-120	100-400		Praharaj & Fortin, 2004	
Broulan site	Хвостохранилище	Канада		2-4	0-120	100-400		Praharaj & Fortin, 2004	
T9	Хвостохранилище	Россия	2	4.4	5.59	>200	6		Karnachuk <i>et al.</i> , 2005

1.4.1.3. Лабораторные культуры ацидофильных СРП

Накопительные культуры. В ходе исследований сульфатредукции в кислых местообитаниях была проведена большая работа по получению накопительных и чистых культур ацидофильных СРП. Как было отмечено выше, зачастую чистые и накопительные культуры СРП из кислых местообитаний удавалось получить только на средах с нейтральным значением рН (Benda, 1957; Fortin *et al.*, 1996, 2000; Ulrich *et al.*, 1998; Wielinga *et al.*, 1999; Benner *et al.*, 2000; Küsel *et al.*, 2001), в то время как на средах с низкими значениями рН положительного эффекта достичь не удавалось (Gyure *et al.*, 1990). Несмотря на это, существует немало примеров получения накопительных культур, осуществляющих процесс сульфатредукции, и в ацидофильных условиях. Накопительная культура сульфатредуцирующих бактерий, растущая при рН 2.9, была получена из хвостохранилища на среде с 10 мМ глицерола и 0.02% дрожжевого экстракта, однако, дальнейшие попытки по выделению чистых культур СРП не увенчались успехом (Johnson *et al.*, 1993).

Из хвостохранилища со значением рН 3.0 была получена накопительная культура СРП на среде с рН 5.5 и высокой концентрацией лактата (52 мМ) (Fortin *et al.*, 1996). Смешанная культура, состоящая из сульфатредуцирующих бактерий рода *Desulfovibrio* и гомоацетогенных бактерий рода *Acetobacterium*, росла на средах с рН в интервале 5.5-8.0. Сульфатредукция полностью ингибировалась при рН 5.5 (van Houten *et al.*, 1995).

В исследовании Hard с соавторами была описана культура *Desulfovibrio salexigens*, растущая на метаноле при рН 4.5, а также описан новый изолят, который рос на метаноле при рН 4.0 (Hard *et al.*, 1997). Однако впоследствии выяснилось, что обе культуры не были чистыми, а представляли собой смешанную культуру СРП и метилотрофной бактерии (Walter, 2002).

Интересный результат был опубликован Meier и соавторами после получения целого ряда накопительных культур с различными значениями pH в интервале от 3.0 до 6.0. В качестве инокулята использовали осадок из карьерного озера ML111 в Германии (Meier *et al.*, 2012), значение pH которого варьировало в интервале от 2.6 до 3.0. Среда для получения накопительных культур содержала повышенные концентрации Fe^{2+} и Al^{3+} , а в качестве источника энергии использовался H_2 . При значении pH накопительных культур 5.0 и 6.0 активность СРП была детектирована через короткий промежуток времени после инокуляции, а лаг-фаза практически полностью отсутствовала. После инкубации был проведен анализ 16S рРНК, с помощью которого удалось установить, что доминирующими микроорганизмами были сульфатредуцирующие бактерии рода *Desulfosporosinus*. При значении pH накопительных культур 3.0 и 4.0 процесс сульфатредукции был зафиксирован после продолжительной лаг-фазы, однако, интенсивность сульфатредукции была значительно выше. В конце инкубации доминирующим видом были представители рода *Thermodesulfobium*. В ходе роста во всех вариантах накопительных культур происходило образование сульфида железа во всём объёме культуральной среды, в то время как в тесной ассоциации с клетками на клеточной поверхности наблюдалось осаждение металлического алюминия, что возможно является механизмом детоксикации растворённого Al при низком pH (Meier *et al.*, 2012).

Ряд накопительных культур, а также 4 новых изолята СРП были получены из Tinto River (Испания). В результате биохимического окисления сульфидных минералов вода в реке имеет низкое значение pH (2.3), а также содержит высокие концентрации железа (около 36 мМ) и сульфата (около 62.5 мМ). С использованием методов клонирования и секвенирования 16S рРНК было установлено, что в осадках Tinto River со значением pH 3.8-5.4 присутствуют СРП (Sanchez-Andrea *et al.*, 2011; 2012). В последующем были получены устойчивые накопительные культуры на средах с pH 4.0 на глицероле, метаноле и водороде; с pH 4.5 на лактате; с pH 5.5 на сукцинате.

Накопительные культуры состояли из двух основных компонентов - сбраживающих бактерий (*Paludibacter* spp., *Oscillibacter* spp) и СРП (*Thermodesulfobium* spp., *Desulfosporosinus* spp., *Desulfitobacterium* spp., *Desulfotomaculum* spp.). С использованием методов последовательных разведений и культивирования на твёрдых питательных средах были получены четыре новых изолята, относящихся к филе *Firmicutes*. Два изолята имели 96% сходство с *Desulfosporosinus acidiphillus*, а третий с *Desulfosporosinus orientis*. Четвёртый изолят имел только 93% сходство с кластером *Desulfosporosinus/Desulfitobacterium* и возможно представляет новый род. Кроме того, в процессе культивирования накопительных культур был установлен факт ингибирования роста органическими кислотами при значении рН среды ниже рK_a (Sanchez-Andrea *et al.*, 2013).

Чистые культуры. Первым изолированными и частично охарактеризованными ацидофильными сульфатредуцирующими бактериями были *Desulfosporosinus*-подобные бактерии (штаммы P1 и M1) (Sen A & Johnson, 1999). Оба штамма были более чем на 99% идентичны друг другу по последовательности гена 16S рРНК и относились к роду *Desulfosporosinus*. Со временем штамм P1 был утерян, а для штамма M1 было показано, что на самом деле, он представляет собой синтрофную культуру, вторым компонентом которой является ацидофильный гетеротроф *Acidocella aromatica*, который окислял глицерол и образовывал H₂. Взаимодействие между двумя организмами обеспечивалось за счёт межвидового переноса водорода (Kimura *et al.* 2006). В последующем представители рода *Desulfosporosinus* были изолированы из многих других кислых местообитаний (например, Küsel *et al.*, 2001; Sen *et al.*, 2003; Meier *et al.*, 2006; Senko *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2009), однако, как уже сообщалось ранее, некоторые изоляты оказались нейтрофилами. Из кислых отходов меднодобывающей промышленности в Норильске (Россия) был изолирован *Desulfosporosinus* sp. OT (Karnachuk *et al.*, 2005), ставший первым представителем рода *Desulfosporosinus*, для которого была определена последовательность генома (Abicht *et al.*, 2011). Из отходов

золотобывающей промышленности (pH 2.4-2.8), был выделен экстремально ацидофильный *Desulfosporosinus* sp. DB (Karnachuk *et al.*, 2009). Позднее был получен новый изолят *Desulfosporosinus* sp. BG (Karnachuk *et al.*, 2015). Все три штамма были устойчивы к высоким концентрациям растворённых металлов (до 650 мг Cu/л). Недавно было показано, что представители рода *Desulfosporosinus* являются ключевыми игроками в микробной сульфатредукции в болотах с низким содержанием сульфатов (Pester *et al.*, 2010).

Первым описанным ацидофильным представителем рода *Desulfosporosinus* стал *D. acidiphillus* штамм SJ4^T, выделенный из осадков озера со значением pH около 3.0, образовавшегося в результате отвода кислых шахтных вод в Chessy-Les-Mines (Франция). *D. acidiphillus* рос в интервале pH 3.6-6.5 с оптимумом при 5.2. Микроорганизм был типичным мезофиллом и рос в интервале температур 25-40⁰С с оптимумом 30⁰С. В качестве доноров электронов *D. acidiphillus* использовал H₂, лактат, пируват, глицерол, глюкозу и фруктозу. Сульфат был единственным используемым акцептором электронов (Alazard *et al.* 2010). Вторым ацидофильным представителем рода стал *D. acididurans* с типовым штаммом M1, который был выделен из White river (pH 3.2, T = 30⁰С, Eh =+500 mV). Штамм M1 рос в интервале pH 3.8-7.0 с оптимумом 5.5 и также являлся мезофиллом. *D. acididurans* M1 в качестве субстратов использовал различные органические кислоты (формиат, лактат, бутират, фумарат, малат и пируват), спирты (глицерол, метанол и этанол), дрожжевой экстракт и сахара (ксилоза, фруктоза и глюкоза). В качестве акцептора электронов помимо сульфата использовались железо, нитрат, тиосульфат и элементная сера (Sanchez-Andrea *et al.*, 2015).

Таким образом, к настоящему времени можно считать доказанным факт наличия микробной сульфатредукции в кислых местообитаниях, однако, основной проблемой изучения данного процесса является получение чистых культур ацидофильных СРП.

1.4.2. Сульфатредукция в условиях высоких температур

В настоящее время известны как термофильные, так и гипертермофильные СРП. Гипертермофилы – это организмы имеющие оптимум роста при температурах выше 80⁰С. С помощью радиоизотопного метода была обнаружена активность СРП при температуре выше 100⁰С в горячих глубоководных осадках, отобранных из гидротермальных выходов в Калифорнийском заливе (Jorgensen *et al.*, 1992). Первым гипертермофильным сульфатредуцирующим микроорганизмом стал *Archaeoglobus fulgidus* VC-16^T, который был выделен из осадков гидротермальных выходов в Средиземном море и оптимально рос при температуре 82⁰С (Stetter *et al.*, 1987). В последующем были выделены и другие гипертермофильные виды рода *Archaeoglobus*. Недавно был описан *Thermodesulfobacterium geofontis*, выделенный из источника в национальном парке Йеллоустон (США). Данный организм оптимально растёт при температуре 83⁰С (Hamilton-Brehm *et al.*, 2013). Также на роль гипертермофильных сульфатредуцирующих микроорганизмов претендуют *S. maquiligensis* (Itoh *et al.*, 1999), *T. tenax* (Siebers *et al.*, 2011) и *V. sauniana* (Itoh *et al.*, 2002), однако, экспериментальных доказательств их способности к сульфатредукции до настоящего времени не представлено.

Микроорганизмы, имеющие оптимум роста в интервале температур 50-80⁰С, называются термофилами. В течение последнего десятилетия было обнаружено и выделено большое разнообразие термофильных СРП, включая *Desulfotomaculum hydrothermale* Lam5^T (Haouari *et al.*, 2008), *Desulfosoma profundum* SPDХ02-08^T (Gregoire *et al.*, 2012), *Desulfovirgula thermocuniculi* RL80JIV^T (Kaksonen *et al.*, 2007), *Desulfonauticus autotrophicus* TeSt^T (Mayilraj *et al.*, 2009), *Thermodesulfovibrio* spp. (Sekiguchi *et al.*, 2008) и *Desulfotomaculum carboxydivorans* CO-1-SRB^T (Parshina *et al.*, 2005).

1.4.2.1. Континентальные кислые термальные источники

Естественные геотермальные зоны связаны с зонами субдукции – линейно протяжённых зон, вдоль которых происходит погружение одних блоков земной коры под другие. В составе зоны субдукции выделяются ведущий и погружающийся края континентальных плит. Результатом взаимодействия этих блоков земной коры являются активный вулканизм и повышенная сейсмичность. В таких зонах магматический слой близок к земной поверхности, через которую просачиваются морские и континентальные воды. Перегретые воды под давлением выходят обратно на поверхность Земли или морского дна, образуя геотермальные поля или подводные гидротермальные системы – типичные местообитания термофилов (Brock, 1986).

Большинство действующих вулканов в пределах суши и островных дуг находятся сейчас в длительных периодах покоя, когда вулканическая деятельность сводится, в основном, к выделению газов. В кратерах, на склонах вулканов или в кальдерах наблюдаются многочисленные выходы вулканических газов и термальных вод. Величина pH данных источников может варьировать в широких пределах, нас же в первую очередь будут интересовать кислые и слабокислые источники с $\text{pH} < 6,0$. Кислые термальные источники по преобладающему анионному составу подразделяются на хлоридные, сульфатные и кремниевокислые. В зонах современного вулканизма наиболее широко распространены сульфатные и хлоридные термальные источники. Состав выходящих газов, как правило, сероводородо-углекислый и углекислый, часто содержащий азот и водород. Выходы хлоридных терм представляют собой конденсаты фумарольных газов с температурой $70\text{-}100^{\circ}\text{C}$ и $\text{pH} < 2,5$. Выходы сульфатных терм большей частью наблюдаются в виде кипящих грязевых котлов и рассеянных восходящих источников с температурой от 30 до 100°C . Значение pH сульфатных терм, как правило, менее $4,5$. Известно два основных способа образования серной кислоты. Во-первых, серная кислота образуется за счёт растворения SO_2 , поднимающегося с

глубины. Во-вторых, источником биогенной серной кислоты служат холодные участки сольфатарных полей, на которой конденсируется влага, и развиваются бактерии, в основном рода *Acidithiobacillus*, окисляющие серу до серной кислоты. Кислые кремниевокислые термальные источники, в составе которых преобладает H_2SiO_3 , характеризуются умеренно-кислыми условиями, высокой минерализацией, водородно-углекислым газовым составом (Басков, Суриков, 1989; Brock, 1986; Заварзин, 1984).

Описанные выше кислые термальные источники содержат термоацидофильную микрофлору, которая приспособилась к воздействию сразу двух экстремальных факторов среды – высокой температуре и низким значениям pH. По этой причине данные источники идеально подходят для изучения процесса диссимиляционной сульфатредукции в термоацидофильных условиях.

1.4.2.2. Интенсивность сульфатредукции в геотермальных источниках

Измерение скорости сульфатредукции в геотермальных источниках, характеризующихся различными температурами (46.7-91.0⁰C) и значениями pH (2.3-9.1), было проведено в национальном парке Йеллоустон (США) (Roouchoudhury, 2004; Zeikus *et al.*, 1983; Fishbain *et al.*, 2003) и в кальдере вулкана Узон на Камчатке (Россия) (Бонч-Осмоловская и др, 1987; Chernyuh *et al.*, 2015; Пименов, 2011). Обобщённые литературные данные по интенсивности сульфатредукции в вышеназванных местностях представлены в Таблице 2.

Источники национального парка Йеллоустон. Из таблицы 2 видно, что скорость сульфатредукции варьирует в широком диапазоне и не зависит от величины pH, температуры или концентрации сульфата в источнике (Roouchoudhury, 2004). Наибольшая активность СРП показана для водорослевых матов, растущих как в нейтральных, так и в ацидофильных условиях. Вероятно, столь высокая интенсивность связана с доступностью и высокой концентрацией разнообразных органических веществ, продуцируемых водорослями (Roouchoudhury, 2004). В то же время, скорость сульфатредукции в

геотермальных источниках значительно ниже скорости сульфатредукции в водорослевых матах из других местообитаний (Canfield and Des-Marais, 1991; Teske *et al.*, 1998). Для измерений в матах характерен высокий разброс данных, что вероятно связано с локализацией СРП в определённом слое водорослевого мата (Roychoudhury, 2004).

Важно отметить, что многие, даже довольно крупные, геотермальные источники непостоянны и зачастую в них происходят сильные изменения физико-химических параметров, что отражается и на составе микробного сообщества. Например, источник Acid Inkspot в национальном парке Йеллоустон изначально имел рН 2.8 и концентрацию сульфатов в 26.82 мМ. Сульфатредукция при таких условиях не была детектирована. В течение года физико-химические параметры источника сильно изменились, в частности, значение рН увеличилось до 5.36, а концентрация сульфатов снизилась до 19.7 мМ. При этих условиях интенсивность сульфатредукции составила 75 нмоль $\text{SO}_4 / (\text{см}^3 \cdot \text{сут})$ (Roychoudhury, 2004).

Скорость сульфатредукции обнаружена в пяти кислых геотермальных источниках национального парка Йеллоустон: Nymph Creek, Cinder Pool, Black Spring, HLF#4 и Norris Geyser Basin site C (Roychoudhury, 2004; Fishbain *et al.*, 2003). Наибольшее значение, 704 нмоль $\text{SO}_4 / (\text{см}^3 \cdot \text{сут})$, получено для осадков из источника Norris Geyser Basin site C, однако, следует отметить, что такое высокое значение было получено однократно, в одной повторности, в то время как в двух других точках значение было <10 нмоль $\text{SO}_4 / (\text{см}^3 \cdot \text{сут})$ (Fishbain *et al.*, 2003). Высокая интенсивность сульфатредукции была показана и для Nymph Creek (212-280 нмоль $\text{SO}_4 / (\text{см}^3 \cdot \text{сут})$) – кислого умеренно термального ручья (47⁰С, рН 2.5), содержащего маты, основным компонентом которого является водоросль *Cyanidium caldarium* (Roychoudhury, 2004; Fishbain *et al.*, 2003).

Таблица 2. Скорость сульфатредукции в гидротермальных источниках национального парка Йеллоустон и кальдеры вулкана Узон

Название источника	Тип источника	Место-положение	Тем-ра, °С	pH	Конц. SO ₄ ²⁻ , мМ	ССР (±2σ, n=3), нмоль SO ₄ / (см ³ ·сут)	Ссылка
Black Sediment Pool	Осадок	США, Йеллоустон	69.8	6.5	0.5	266±43	Roychoudhury, 2004
			69	6.6	0.6	87	Fishbain <i>et al.</i> , 2003
Nymph Creek	Соскоб мата из кислого ручья	США, Йеллоустон	46.7	2.54	2.95	280±118	Roychoudhury, 2004
			38-47	2.5	4.7	212	Fishbain <i>et al.</i>, 2003
Mushroom Spring	Зелёный водорослевый мат	США, Йеллоустон	59.1	8.4	0.3	483±300	Roychoudhury, 2004
Obsidian Pool	Осадок	США, Йеллоустон	84.5	6.45	0.64	14±3.3	Roychoudhury, 2004
			89	6.3	0.6	104	Fishbain <i>et al.</i> , 2003
Inkspot	Осадок	США, Йеллоустон	84.1	6.05	39.1	88±33	Roychoudhury, 2004
Acid Inkspot	Осадок	США, Йеллоустон	77.2	5.36	19.7	75±27	Roychoudhury, 2004
Cinder Pool	Осадок	США, Йеллоустон	85.5	4.02	0.99	1±0.27	Roychoudhury, 2004
			91	2.5	0.5	2	Fishbain <i>et al.</i>, 2003
Black Spring	Осадок	США, Йеллоустон	83.8	2.69	2.03	5±2.75	Roychoudhury, 2004
			80	3.0	2.6	5.6	Fishbain <i>et al.</i>, 2003
HLFG#3	Осадок	США, Йеллоустон	74.8	9.1	1.84	101±44	Roychoudhury, 2004
HLFG#4	Осадок	США, Йеллоустон	81.2	2.86	2.52	18±4	Roychoudhury, 2004
Octopus Spring	Водорослевый мат	США, Йеллоустон	59	нейтральный	0.19	91±34	Zeikus <i>et al.</i> , 1983
Washburn Pool A	Осадок с кромки	США, Йеллоустон	50	нейтральный	10	6±2	Zeikus <i>et al.</i> , 1983
Inc Pot Spring	Осадок с кромки	США, Йеллоустон	70	нейтральный	17.8	6.5±2	Zeikus <i>et al.</i> , 1983
Inc Pot Spring	Вода	США, Йеллоустон	70	нейтральный	17.8	3±2	Zeikus <i>et al.</i> , 1983
New Pit Spring	Мат	США, Йеллоустон	56	6.1	31.6	11111	Fishbain <i>et al.</i> , 2003
Norris Geyser Basin, site C	Осадок	США, Йеллоустон	88	2.3	87.5	704	Fishbain <i>et al.</i>, 2003
Norris Geyser Basin, site D	Осадок	США, Йеллоустон	42	2.2	6.5	1.6	Fishbain <i>et al.</i>, 2003

Таблица 2. Продолжение

Название источника	Тип источника	Место-положение	Тем-ра, °С	pH	Конц. SO ₄ ²⁻ , мМ	ССР (±2σ, n=3), нмоль SO ₄ / (см ³ ·сут)	Ссылка
1506	Осадок	Россия, Узон	57	5.7	1.82	4.2	Пименов и др., 2011
Грифон Заварзина	Осадок	Россия, Узон	58	6.2	0.36	0.9	Пименов и др., 2011
Оранжевый-нейтральный	Серый мат + осадок	Россия, Узон	70	5.8	0.94	1.5	Пименов и др., 2011
Бурлящий	Осадок	Россия, Узон	86	6.7	1.73	0.21±0.05	Chernyh <i>et al.</i> , 2015
Ручей из Бурлящего, место А	Осадок	Россия, Узон	60	нейтральный	н.д.	2.1±0.4	Chernyh <i>et al.</i> , 2015
Ручей из Бурлящего, место В	Осадок	Россия, Узон	45	нейтральный	н.д.	7.7±0.7	Chernyh <i>et al.</i> , 2015
Термофильный	Осадок	Россия, Узон	72	6.3	0.78	8.4	Пименов и др., 2011
Ручей из Термофильного, место А	Осадок	Россия, Узон	65	нейтральный	н.д.	38	Пименов и др., 2011
Ручей из Термофильного, место В	Осадок	Россия, Узон	63	нейтральный	н.д.	37	Пименов и др., 2011
Ручей из Термофильного, место С	Осадок	Россия, Узон	53	нейтральный	н.д.	74	Пименов и др., 2011
1507	Осадок	Россия, Узон	75	6.5	1.7	0.25	Пименов и др., 2011
Трещинный	Осадок	Россия, Узон	80	6.3	0.78	0.23	Пименов и др., 2011
Оранжевый-кислый	Осадок	Россия, Узон	80	2.1	0.75	0.11	Пименов и др., 2011

Полужирным шрифтом выделены источники с термоацидофильными условиями

С использованием специфических праймеров для ПЦР были получены последовательности генов *dsrAB* из источника Nymph Creek. Филогенетический анализ позволил определить, что эти последовательности имеют высокое сходство с последовательностью генов *dsrAB* родов *Desulfotomaculum* и *Thermodesulfobium* (Fishbain *et al.*, 2003). Для источников Cinder Pool, Black Spring и HCFG#4 характерна низкая интенсивность сульфатредукции, что сочетается с низким содержанием органических веществ. Предполагается, что роль доноров электронов в такого типа местообитаниях играют H_2 и CO (Fishbain *et al.*, 2003).

Источники кальдеры Узон. Измерение скорости сульфатредукции в кальдере вулкана Узон впервые были проведены в источнике Термофильном при температурах 60-75 °С и нейтральных значениях pH. В ходе измерений была выявлена высокая интенсивность сульфатредукции – 4.56 мкмоль/см²·сутки (Бонч-Осмоловская и др, 1987). Позднее было проведено исследование активности СРП в восьми термальных источниках в температурном диапазоне 58-90⁰С и pH 2.1-6.5. Наибольшие скорости сульфатредукции (0.9-8.4 нмоль SO_4 / (см³·сут)) наблюдались в интервале температур 58-70⁰С и нейтральном значении pH. Повышение температуры и понижение pH приводило к резкому снижению скорости сульфатредукции, что отличается от результатов полученных Roychoudhury и соавторами (Пименов, 2011). Согласно недавно опубликованным данным, скорость сульфатредукции была измерена в источнике Бурлящий и вытекающем из него ручье. Оказалось, что в самом источнике активность СРП очень низка, в то время как в ручье с более низкими температурами скорость сульфатредукции принимает высокие значения (Chernyh *et al.*, 2015). Исходя из имеющихся в литературе данных, сульфатредукция в источниках кальдеры Узон была обнаружена исключительно в нейтральных условиях, аналогичные исследования для кислых геотермальных источников в литературе не отражены.

1.4.2.3. Термоацидофильные СРП

В настоящее время к термоацидофильным СРП можно отнести только один вид – *Th. narugense* (Mori *et al.*, 2003). Данный организм растёт в интервале значений рН 4.0-6.5 с оптимум при 5.5-6.0, и в диапазоне температур 37-65⁰С с оптимумом при 50-55⁰С. *Th. narugense* осуществляет хемолитоавтотрофный рост, где Н₂ является донором, а сульфат акцептором электронов. В качестве альтернативных акцепторов могут быть использованы тиосульфат, нитрат и нитрит, но рост с ними гораздо хуже. Кроме того, данный микроорганизм способен к росту на формиате вместо Н₂. *Th. narugense* был описан как представитель нового рода и нового семейства в 2003 году (Mori *et al.*, 2003).

Экология представителей рода *Thermodesulfobium* довольно разнообразна. Так, например, *Th. narugense* был выделен из горячего источника Narugo (Японии), который находился в непосредственной близости от кислого озера Katanuma. В источнике находился микробный мат, образованный преимущественно сероокисляющими бактериями *Thiomonas thermosulfata*. Температура и рН воды в источнике были 58⁰С и 6.9 соответственно (Mori *et al.*, 2003). Некоторые клоны близкие к *Thermodesulfobium* были детектированы в различных уголках планеты. Среди них есть как уже упомянутые нами мезофильные кислые местообитания – Tinto river в Испании (Sanchez-Andrea *et al.*, 2013) и карьерное озеро ML111 в Германии (Meier *et al.*, 2012), так и термальные местообитания - источники кальдеры Узон на Камчатке (Burgess *et al.*, 2012) и геотермального поля Los Azufres в Мексике (Brito *et al.*, 2014). Следует отметить, что из проб с геотермального поля Los Azufres удалось получить бинарную культуру, состоящую из компонентов близких к *Thermodesulfobium* и *Desulfurella* (Brito *et al.*, 2014). Кроме того, в кислом источнике национально парка Йеллоустон были получены последовательности гена *dsrAB* близкие к таковым у *Th. narugense* (Fishbain *et al.*, 2003).

К термоацидофильным СРП могут быть отнесены и три представителя филума *Crenarchaeota*. Первым организмом, в описании которого упоминается способность к сульфатредукции в термоацидофильных условиях, была гипертермофильная архея *C. maquilingensis*, растущая в интервале температур 60 – 92 °С и в интервале рН 2.3 – 6.4 с оптимумом роста при 85°С и рН 3.7 – 4.2 (Itoh *et al.*, 1999). Позже, на основании анализа генома, было высказано предположение, что гипертермофильная архея *T. tenax* также может быть способной к росту за счет сульфатного дыхания. Данный организм растёт в интервале температур 55 – 96 °С с оптимумом в 86 °С и в интервале рН 1.7 – 6.7 с оптимумом рН 5.6 (Siebers *et al.*, 2011; Zillig *et al.*, 1981; Fischer *et al.*, 1983). Кроме того, основываясь на результаты анализа генома, была заявлена способность к сульфатредукции у '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' (Gumerov *et al.*, 2011), оптимально растущей при температуре 85°С и рН 5-5.5 (Prokofeva *et al.*, 2005). Однако экспериментальных доказательств процесса диссимиляционной сульфатредукции у этих организмов не было представлено.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Для проведения исследования из коллекции DSMZ были получены следующие коллекционные культуры: *Thermoproteus tenax* DSM 2078, *Vulcanisaeta souniana* DSM 14430, *Vulcanisaeta distribute* DSM 14429 и *Caldivirga maquilingsis* DSM 13496. Чистота культур была проверена с использованием методов амплификации и секвенирования гена 16S рРНК. Также у сотрудницы Лаборатории гипертермофильных микробных сообществ ФИЦ Биотехнологии РАН Прокофьевой М.И. была получена культура, состоящая из двух компонентов – '*Candidatus Vulcanisaeta moutnovskia* 768-28' и *Thermoproteus 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.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Отбор проб

Отбор проб проводился в 2014 - 2015 годах у подножия вулкана Мутновский и в кальдере вулкана Узон. Пробы из термальных источников отбирали в стеклянные 50 мл флаконы с газонепроницаемой пробкой из бутиловой резины и с завинчивающимися алюминиевыми крышками, которые заполняли пробой до самого верха, герметично закрывали и транспортировали в лабораторию без температурного контроля. Во время отбора проб измеряли температуру, Eh и pH воды и осадков источника. Характеристика источников и отобранных проб дана в главе "Результаты".

2.2.2. 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 в 15 мл пробирках Хангейта с завинчивающейся крышкой. В каждую пробирку вносили пробу объёмом 6 мл с соотношением осадка к жидкой фазе 1:1. Газовую фазу заполняли 100% CO_2 . Через пробку в каждую пробирку шприцем вносили по 0.2 мл $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ ($37 \cdot 10^4$ Бк) или ^{14}C -бикарбоната ($37 \cdot 10^4$ Бк). 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). Для определения влияния ряда субстратов на интенсивность сульфатредукции пользовались той же методикой, что описана выше, с тем лишь исключением, что непосредственно перед инкубацией вносили следующие субстраты: дрожжевой экстракт (1 г/л), лактат (5 мМ), ацетат (5 мМ), этанол (40 мМ), метанол (40 мМ) и H_2 (50% в газовой фазе). Аналогичным образом были проведены измерения интенсивностей сульфатредукции и автотрофной фиксации CO_2 в экспериментах с чистыми культурами.

Расчёт интенсивности данных процессов осуществляли по следующему уравнению:

$$I = \frac{(r - r_c) \cdot C \cdot a}{RT},$$

где I – интенсивность процесса, r – радиоактивность образовавшегося продукта, r_c – радиоактивность этого же продукта образовавшегося в абиотическом контроле, R – изначальная радиоактивность меченного субстрата добавленного

к пробе, C - концентрация субстрата в пробе, α – поправочный коэффициент на фракционирование изотопа (1.06 для ^{14}C , или 1.045 для ^{35}S) и T – время инкубации. Для чистых культур интенсивность процесса приводили в пересчёте на одну клетку.

2.2.3. Приготовление среды для термоацидофильных СРП

Для получения и культивирования накопительных и чистых культур термоацидофильных СРП использовалась модифицированная *среда Пфеннига* (Pfennig, 1965). Для приготовления среды использовали следующие растворы (г/л):

раствор 1:	$\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33.0
	$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	33.0
	KCl	33.0
раствор 2:	KH_2PO_4	33.0
	NH_4Cl	33.0

Растворы вносили в количестве 10 мл на литр дистиллированной воды.

Раствор микроэлементов (Кевбрин, Заварзин, 1992), мг/л:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (соль Мора)	784
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	238
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	395
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	24
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	144
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2
Na_2SeO_4	94
HBO_3	6
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	99

Сначала соль Мора растворяли в 5 мл концентрированной соляной кислоты, далее добавляли дистиллированную воду, а уже затем все остальные компоненты. Раствор микроэлементов вносили из расчёта 1 мл на 1 л среды.

Раствор витаминов по Волину (Wolin et al., 1963), мг/л:

биотин	20
фолиевая кислота	20
пиридоксин гидрохлорид	100
рибофлавин	50
тиамин	50
никотиновая кислота	50
пантотеновая кислота	50
B ₁₂	1
p-аминобензойная кислота	50
тиоктовая кислота	50

На 1 л среды вносили 1мл раствора витаминов.

Субстраты и акцепторы роста. Для культивирования накопительных и чистых культур, а также для проверки использования различных субстратов роста были использованы различные органические вещества: дрожжевой экстракт, пептон (оба 1 г/л), глюкоза, фруктоза, мальтоза, сахароза, лактоза, галактоза, арабиноза, ксилоза, раффиноза (5 мМ каждой), ацетатат, лактат, пируват, малат, пропионат, бутират, фумарат, сукцинат, цитрат, формиат, пальмитат, стеарат (5 и 20 мМ каждого), метанол, этанол, пропанол (20 и 40 мМ каждого).

Если в качестве субстрата использовался Н₂, то он входил в состав газовой фазы в смеси с СО₂ в соотношении 4:1 соответственно.

Если в качестве субстрата использовался СО, то он входил в состав газовой смеси с N₂ в соотношениях 1:1, 1:9 и 1:19.

В качестве акцепторов электронов были использованы нитрат, нитрит, тиосульфат, сульфит (1 г/л каждого), сульфат (1 и 3 г/л), элементная сера (10

г/л), цитрат, фумарат (10 мМ каждого) и O₂ (2, 5 или 20% от состава газовой фазы).

Проверка устойчивости СРП к антибиотикам. Антибиотики ампициллин, новобиоцин, хлорамфиникол, канамицин А, стрептомицин, оксипиллин, неомицин, полимиксин В, бензилпенициллин и ванкомицин добавлялись в среду культивирования в количестве 100 мкг/мл перед началом инкубации.

Методика приготовления анаэробной жидкой среды. В приготовленную базовую среду вносили резазурин до появления розовой окраски, после чего кипятили в течение 5 минут и охлаждали на водяной бане под непрерывным током СО₂, который пропускаться через восстановленную водородом колонку с медью для удаления следовых количеств кислорода. После охлаждения в среду добавляли витамины, микроэлементы и растворимые сульфаты роста и акцепторы. Элементную серу добавляли непосредственно в пробирки. Под током СО₂ среду переливали в дозатор, после чего добавляли 600 мг/л Na₂S·9H₂O. В ходе восстановления среда обесцвечивалась. После этого подводили рН до необходимого значения, используя 6N растворы NaOH и HCl. Далее полученную среду разливали по пробиркам также под током СО₂.

Для культивирования термоацидофильных микроорганизмов использовали пробирки Хангейта объёмом 15 мл, заполняемые средой на 5 мл. При необходимости получения биомассы культивирование производили в 2-литровых бутылках, заполняемые средой на 800 мл.

Для получения чистых культур умеренно термоацидофильных прокариот (рН 4.8 и температура 55⁰С) использовали метод агаровых столбиков. Среду готовили и разливали по пробиркам как описано выше с тем исключением, что вносили агар в концентрации 2%. Для проверки роста на твёрдых средах гипертермофильных архей (инкубация при 85⁰С) приготовленную базовую среду разливали по 5 мл под током СО₂ в стеклянные флаконы фирмы Bellco объёмом 90 мл. В качестве полимеризирующего агента использовали Gelrite (1%) с добавлением MgSO₄ (0.5 г/л).

Автоклавирование среды проводили при 1 атм. Если в качестве акцептора использовалась элементарная сера, то автоклавирование производили при 0.5 атм.

2.2.4. Получение чистых культур

Чистые культуры получали с использованием метода последовательных десятикратных разведений с последующим пересевом на агаровые столбики. При использовании метода агаровых столбиков сначала агар расплавляли и остужали его до 50⁰С, после чего вносили посевной материал, перемешивали и оставляли пробирки при комнатной температуре для того, чтобы агар застыл. Далее проводили инкубацию в термостате. Для переноса колоний с твёрдой питательной среды на жидкую использовали шприц с толстой иглой. Все манипуляции проводили под током СО₂, пропущенного через стерильный фильтр.

2.2.5. Исследование морфологии и тонкого строения клеток

Световая микроскопия. Рост клеток и клеточная морфология были исследованы с использованием светового микроскопа Olympus CX-41 с фазово-контрастным устройством.

Клетки считали в 20 полях зрения светового микроскопа (диаметр 0.17 мм), после чего определяли среднее значение. Препарат готовили путём помещения 2 мкл среды под покровное стекло (18x18 мм). Численность клеток в 1 мл среды рассчитывали по следующей формуле:

$$X = \frac{N \cdot S \cdot 10^9}{\pi \cdot R^2 \cdot V},$$

где X – количество клеток в 1 мл среды, N – среднее количество клеток в поле зрения, S – площадь стекла в мм², R – радиус поля зрения в мкм, V – объём капли в мкл.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Данная работа была проведена совместно с сотрудником ФИЦ Биотехнологии РАН к.б.н. Кострикиной Н.А. Исследование тонкого строения клеток проводили с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100С (Jeol, Токуо, 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.

2.2.6. Аналитические методы исследования

Образование H_2S определяли колориметрическим методом с N,N-диметилпарафенилендиамином в модификации Трюпера и Шлегеля (Trüper, Schlegel, 1964) по развитию сине-голубой окраски с последующим определением на спектрофотометре (Beckman, модель 35) при $\lambda = 670$ нм. При этом 30 мкл среды или 300 мкл газовой фазы добавляли к 500 мкл 5% раствора ацетата цинка. На данном этапе происходит фиксация H_2S в виде ZnS. Далее добавляли 1260 мкл дистиллированной H_2O и 200 мкл 0.2% раствора диметил-п-фенилендиамин в 20% растворе серной кислоты. Полученную смесь тщательно встряхивали, после чего добавляли 10 мкл 10% раствора $Fe(NH_4)_2$ в 2% серной кислоте, в результате чего получали $Fe(NH_4)_2SO_4$. Данную смесь снова встряхивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут для развития окраски. Далее проводили измерение и осуществляли расчёт по калибровочной кривой. Для определения концентрации сероводорода и сульфидов в природных источниках 30 мкл воды фиксировали в 500 мкл 5% раствора ацетата цинка, после чего в таком виде транспортировали в лабораторию без температурного контроля, где осуществляли определение согласно вышеописанной методике.

Концентрацию сульфат– и нитрат– анионов измеряли на ионном хроматографе «Стайер» (Россия).

Определение концентрации водорода осуществляли на хроматографе «Хроматэк Кристалл 5000.1» с использованием колонки Hayesep N 80/100. Газ-носитель – аргон, при температуре колонки в 40⁰С.

Элементы карбонатной системы (гидрокарбонат ион и свободную углекислоту) определяли методом титриметрии. Гидрокарбонат ион определяли титрованием 0.01 Н раствором HCl в присутствии индикатора метилового оранжевого, а свободную углекислоту - титрованием 0.1 Н раствором NaOH в присутствии фенолфталеина.

Ниже проведены методы, используемые в ходе определения гидрохимического состава вод, который проводили совместно с заведующей ПНИЛ гидрохимии НОЦ "ВОДА" Хвощевской А.А. на базе Института природных ресурсов Томского политехнического университета.

Катионы и анионы: NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻, Cl⁻, PO₄³⁻, Br⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, Li⁺, определяли методом ионной хроматографии на двухканальном безреагентном ионохроматографическом комплексе ICS-5000 с кондуктометрическим детектированием производства компании Dionex – Thermo Scientific (США) с общим автосемплером. Для определения анионов применяли аналитическую колонку IonPac AS19 (2×250 мм) и защитную колонку IonPac AG19 (2×50 мм). Измерения проводились при режиме рабочих условий: скорость подачи элюента – 0.36 см³/мин; рабочее давление в насосе – не более 2000 psi; температура ячейки – 35⁰С, температура колонки – 30⁰С. В качестве элюента использовали раствор гидроксида калия, генерируемый в режиме градиента концентрации с полным разделением пиков в течение 45 мин. Определение катионов проводили в режиме изократического элюирования с полным разделением пиков в течение 30 мин на аналитической колонке IonPac CS 16. Объем инъекции 25 мл. Калибровку прибора проводили с использованием основных комбинированных градуировочных растворов (Dionex, США).

Определение общего органического углерода и растворимого азота

проводили на анализаторе Liquid TOC компании Elementar (Германия) с детектором инфракрасного излучения методом высокотемпературного каталитического окисления соединений углерода и азота до CO₂ и NO, соответственно. В основе работы анализатора лежит принцип двухступенчатого испарения и разложения пробы, с последующим высокотемпературным окислением паров на слое катализатора. Окисление проводили в присутствии кислорода при температуре 850 °С.

Определение содержания в водах элементов: Li, Be, B, Na, Mg, Al, Si, P, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Th, U, проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS). В основе метода ICP-MS лежит использование аргоновой индуктивно связанной плазмы в качестве источника ионов и масс-спектрометра для разделения и последующего детектирования этих ионов. Анализ выполняли с использованием масс-спектрометра NexION 300D (PerkinElmer, США) при следующих рабочих параметрах: мощность плазмы 1600 Вт, распыляющий поток аргона 0.86-0.9 л/мин, расход плазмообразующего газа 16 л/мин, расход вспомогательного газа 1.2 л/мин. Масс-спектрометрические измерения проводили в стандартном и коллизионном режимах, при расходе гелия 2.8 мл/мин в последнем случае. Устранение полиатомных интерференций осуществляли с применением процесса уменьшения кинетической энергии ионов, реализуемого KED-режимом (kinetic energy discrimination) в столкновительной ячейке в присутствии инертного газа гелия. Расчет содержания элементов в анализируемом образце проводили с учетом величины предела обнаружения, характерной для данной анализируемой системы и условий настройки масс-спектрометра.

Все лабораторные измерения проводили при температуре 20±5°С.

2.2.7. Хемотаксономический анализ

Хемотаксономический анализ проводили совместно с к.х.н. Новиковым А.А. на базе РГУ нефти и газа имени И.М. Губкина.

Анализ клеточных жирных кислот, входящих в состав липидов был проведён с помощью метода хромато-масс-спектрометрии (Thermo Scientific Trace GC Ultra DSQ II, HP-5MS column, EI 70 eV) производных метилового эфира, полученных из 5 мг лиофилизированного клеточного материала, предварительно обработанного безводной смесью HCl/MeOH (Mori *et al.*, 2003). Содержание клеточных жирных кислот определяли в процентах от площади пика общего количества ионов. Качественный анализ полярных липидов был определён с использованием хроматографии на бы 2D-TLC согласно методике описанной ранее (Slobodkina *et al.*, 2013).

2.2.8. Выделение ДНК

Выделение ДНК из отобранных проб с целью определения структуры микробного сообщества проводили в 3 этапа.

1) Разрушение и денатурация.

- В пробирку с закручивающейся крышкой объёмом 2 мл помещали 400 мкл пробы, затем добавляли 200 мг стеклянных бус (Sigma-Aldrich, США) диаметром 425-600 мкм и 200 мг стеклянных бус диаметром менее 106 мкм и небольшое количество лизоцима.

- На гомогенизаторе FastPrep®-24 Instrument (MP Biomedicals, США) осуществляли разрушение клеток на максимальной скорости в течение 40 секунд.

- Пробирки помещали на термошейкер на 30 мин при 37°C, 530 rpm.

- Далее добавляли 300 мкл лизирующего раствора (0,1M NaCl, 0,5M Трис-HCl [pH 8.0]), 25 мкл протеиназы-K (20 мг/мл), 6 мкл SDS (10% раствор) и инкубировали на термошейкере в течение 40 мин при 50 °C.

- Последующая инкубация в течение 10 мин при 60 °С, 530 rpm.

2) Промывка.

- К получившемуся лизату добавляли 380 мкл фенола, 380 мкл хлороформа, после чего перемешивали на ротаторе в течение 15 мин.

- Центрифугирование на максимальных оборотах на центрифуге Centrifuge 5430 (Eppendorf AG, Hamburg) в течение 15 мин.

- Верхнюю фракцию, содержащую ДНК, переносили в чистую пробирку и добавляли равный объём хлороформа.

- Далее осуществляли перемешивание на ротаторе с последующим центрифугированием на максимальных оборотах. Продолжительность каждой процедуры составляла 15 мин.

- Процедура промывки ДНК повторялась дважды.

3) Осаждение.

- Водную фракцию переносили в чистую пробирку и добавляли 3М ацетат натрия (рН 5,2) (0,1 от объема пробы) и 90% изопропанол (0,7 от объема пробы), после чего пробирки перемешивали.

- Далее осуществляли инкубацию при комнатной температуре в течение 40 мин для осаждения ДНК. Затем смесь центрифугировали на максимальных оборотах в течение 15 мин.

- Супернатант сливали, а к получившемуся осадку добавляли 500 мкл 70% этанола и центрифугировали на максимальных оборотах в течение 7 мин.

- Повторяли вышеописанный пункт, но уже с использованием 90% этанола.

- Далее сливали супернатант и высушивали пробирки.

- Полученный осадок ресуспендировали в 70 мкл TE-буфер.

Выделение ДНК из чистых и накопительных культур проводили по методике (Marmur, 1961) в модификации:

1) Пробу (2-4 мл) помещали в центрифужные пробирки и осаждали в течение 10 мин при 14100 g при 4 °С. Полученный осадок ресуспендировали в TNE буфере рН 7.4 (Tris 20 mM, 15 mM NaCl, ЭДТА 20 mM).

2) Добавляли лизоцим (5 мкг/мл) и РНКазу (200 мкг/мл), с последующей инкубацией в течение 30 мин при 37°C.

2) Добавляли протеиназу К (5-10 мкг/мл) и SDS (0.5 %). Полученную смесь инкубировали в течение 30 мин при 54 °С с последующим охлаждением.

3) Вносили равный объём охлаждённой смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (50:50:1), перемешивали в течение 10 мин и центрифугировали 10 мин при 14100 g.

4) Водную фазу отбирали и переносили в новую пробирку, где смешивали с равным объёмом хлороформа и затем центрифугированием в течение 5 мин при 14100 g. Эту процедуру повторяли дважды.

5) К полученной водной фазе добавляли 0.1 объёма 3 М цитрата натрия (рН 5.2) и два объёма охлаждённого 96 % этилового спирта. Далее инкубировали в течение 60 мин при – 20 °С.

6) ДНК собирали путём центрифугирования в течение 5 мин при 14100 g, последовательно промывали 70 и 96 % этанолом, высушивали на воздухе и добавляли ТЕ буфер (10 мМ Tris, 1 мМ ЭДТА, рН 7.4).

Для визуализации ДНК использовали электрофорез в 1 % агарозном геле при напряжённости электрического поля 7 В/см. Окрашивание геля производилось 0,1 % водным раствором бромистого этидия. Визуализация результатов проводилась с использованием трансиллюминатора с длиной волны 312 нм.

2.2.9. Подготовка библиотеки фрагментов генов 16S рРНК

С целью получения библиотек мы применяли метод ПЦР, где использовали универсальные праймеры на четвертый вариабельный участок гена 16S рРНК бактерий и архей: UNIV 515F/806R (Caporaso *et al.*, 2012). После *in silico* тестирования праймеров с помощью online сервисов Silva (<http://www.arb-silva.de/>) и Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) в их последовательность было решено внести изменения: (UNIV 515F: 5' - AAT GAT

ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT ATG GTA ATT GTG TGB CAG
CMG CCG CGG TAA - 3'; UNIV 806R: 5' – CAA GCA GAA GAC GGC ATA
CGA GAT XXX XXX XXX XXX AGT CAG TCA GCC GGA CTA CHV GGG
TAT CTA AT — 3'; где XXX XXX XXX XXX соответствует
последовательности использовавшегося баркода, а модифицированные позиции
обозначены жирным шрифтом).

Состав раствора для проведения ПЦР: H₂O-12,26 мкл; Taq Red буфер (Евроген, Россия) - 5 мкл; UNIV 515F (50мМ) – 1 мкл; dNTP - 0,5 мкл (Евроген, Россия); Taq ДНК полимеразы 5 ед./мкл (Евроген, Россия) - 0,25 мкл. В ПЦР пробирки, объемом 200 мкл, вносили 19 мкл смеси, 1 мкл праймера UNIV 806R (50мМ) и 5 мкл образца ДНК. Для каждой пробы было сделано 3 повторности и отрицательный контроль, где вместо образца ДНК вносилась стерильная вода. Для проведения ПЦР использовали следующую программу: предварительная денатурация при 95°C в течение 3 мин, денатурация – при 94°C в течение 20 секунд, отжиг праймеров – при 57°C в течение 20 секунд, элонгация – при 72°C в течение 25 секунд (26 циклов), финальная элонгация-10 мин.

Полученные ампликоны разделяли в 2% агарозном геле с помощью электрофореза. Полученные полосы вырезали из геля скальпелем и очищали при помощи набора Cleanup Standard (Евроген, Россия).

2.2.10. Секвенирование и анализ результатов при определении состава микробного сообщества.

Секвенирование проводили на системе MiSeq (Illumina, США). Для проведения процедуры секвенирования использовали наборы реагентов, способных обеспечить длину прочтения в 300 нуклеотидов с каждого конца ампликона.

Для анализа были использованы левосторонние (left-handed reads, R1) прочтения, так как правосторонние прочтения (right-handed reads, R2) были низкого качества. Наличие последовательности праймера UNIV 806R

проверяли ПО CLC Genomics Workbench software ver. 7.5 (Qiagen, Germany). При обнаружении адаптер обрезался. Прочтения без последовательности UNIV 806 для дальнейшего анализа не использовались. Демультеплексирование производили при помощи скрипта `split_libraries_fastq` ПО Quantitative Insight Into Microbial Ecology (QIIME) ver. 1.8.0 (Caporaso *et al.*, 2010).

Обработка и анализ последовательностей проводили в QIIME ver. 1.8.0. При анализе данных был использован фильтр со следующими параметрами:

- минимальное качество прочтения нуклеотида - 30;
- максимальная длина гомополимерного участка - 6;
- длина прочтения - 249 – 259 п.о.

Проверку прочтений на химерность и формирование операционных таксономических единиц (ОТЕ) осуществляли по описанному ранее алгоритму (Bragina *et al.*, 2015). Для характеристики альфа разнообразия (индекс Шэннона и Chaol) использовалась случайная выборка из 48000 прочтений на образец. Для анализа операционных таксономических единиц были извлечены референсные последовательности из базы данных GenBank с использованием праймеров UNIV 806R и UNIV 515F. Далее полученные референсные последовательности были выровнены с полным набором прочтений. Для дальнейшего анализа использовали прочтения, которые были схожи с референсными последовательностями более чем на 94%. Представленность операционных таксономических единиц была определена с помощью QIIME на основе базы данных Silva (<https://www.arb-silva.de/>). Для распределения полученных последовательностей по исследуемым источникам использовали программу GetIsolationSources.

2.2.11. Полимеразная цепная реакция

Для амплификации гена 16S рРНК бактерий и архей были использованы следующие праймеры: U515F (5'-GTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3', этот прямой праймер использовали как для бактерий, так и архей), Bac907R (5'-

CCGTCAATTCMTTTGAGTTT-3') (Muyzer *et al.*, 1993) и Arch915R (5'-GTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3') (Casamayor *et al.*, 2000). Для идентификации *Thermoproteus uzoniensis* использовали праймеры TuzF1068F (GACCCCCACCCCTAGTTGCTTCCCCGCT) и Tuz1446R (GAGTTCTCTGCTCGTCCCCCACCCG). Для ДГГЭ-анализа к 5'-концу праймера U515F был добавлен GC-clamp (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGC-CCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG-3'). Амплификацию проводили в два этапа. На первом этапе использовали обычные праймеры, после чего осуществляли второй этап амплификации, используя праймеры с GC-clamp.

Состав реакционной смеси для проведения ПЦР из расчёта на 20 мкл: 2 мкл 10x буфера (Eurogen buffer с 1.5 mM MgCl₂), 12.5 mM каждого диоксинуклеотидтрифосфата (Евроген, Россия), 20 пМ каждого праймера, 1.2 Е Taq-полимеразы (Евроген, Россия) и приблизительно 10 нг ДНК. ПЦР проводили в одноканальном амплификаторе (Perkin Elmer Cetus, США).

Для проведения ПЦР использовали следующую программу: начальная денатурация ДНК при 94 °С в течение 5 мин; 33 цикла денатурации 94 °С в течение 30 с; отжиг праймеров при 52 °С (для бактериальной системы праймеров), 62 °С (для архейной системы праймеров) и 75 °С (для ДГГЭ-адаптированных праймеров) в течение 30 с; элонгация цепи - 72 °С 1 мин; завершающий цикл - 72 °С в течение 10 мин.

При использовании праймеров TuzF1068F и Tuz1446R применялась следующая программа: начальная денатурация ДНК при 95 °С в течение 3 мин; один цикл денатурации 93 °С в течение 20 с; отжиг праймеров при 68 °С в течение 10 с; элонгация цепи - 72 °С 30 с 33 цикла; завершающий цикл - 72 °С в течение 15 мин.

Амплификация в реакционной смеси без ДНК служила отрицательным контролем. Продукты амплификации визуализировали в 1 % агарозном геле.

2.2.12. ДГГЕ-анализ

Разделение продуктов амплификации осуществляли в полиакриламидном геле (8%, v/v) с градиентом акриламида от 35 до 70 % в 0,5 x TAE буфере. В качестве денатурирующих агентов были использованы 7 М мочевины (BioRad) и 40 % формамид (Fluca). ДГГЭ осуществляли в камере SCIE-PLAS (Йоркшир, Англия) при напряжении 70 В и температуре 60 °С в течении 17 ч. После электрофореза гели промывали дистиллированной водой и окрашивали SYBR® Gold (Molecular probes, Лейден, Нидерланды) в течение 40 мин в темноте. Полосы продуктов амплификации были визуализированы на трансиллюминаторе, вырезаны и инкубированы в пробирках с 20 мкл дистиллированной воды для элюирования ДНК. Затем полученные продукты были вновь амплифицированы с соответствующими праймерами, с последующей визуализацией в 1.5 % агарозном геле, и очищены с помощью Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, США).

2.2.13. Определение последовательности гена 16S рРНК

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 секвинатора ABI 3730 (“Applied Biosystems”, США) в соответствии с инструкцией изготовителя.

2.2.14. Филогенетический анализ

Филогенетические деревья, основанные на сравнении последовательности 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).

2.2.15. Определение последовательности полного генома

Полногеномное секвенирование проводилось под руководством к.б.н. Тоцакова С.В. на базе Балтийского федерального университета имени Имануила Канта с использованием платформы Illumina Miseq согласно протоколу производителя. Для сборки генома в одну хромосому использовали Spades 3.6.0 (Bankevich *et al.*, 2012).

2.2.16. Исследование протеома у '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' и *T. izoniensis* 768-20

Данная работа была выполнена при участии проф. Голышина П.Н. на базе School of Biological Sciences, Bangor University (Великобритания).

Лизис клеток и получение белкового перевара. Суспензию клеток растворяли в лизирующем буфере (8 М мочевины, 2 М тиомочевина, 5% CHAPS, 2 мМ ТСЕР·НСІ и ингибитор протеаз). Далее осуществляли гомогенизацию клеток с помощью ультразвуковой обработки на ледяной бане. Полученный гомогенат центрифугировали при 20 000 g в течение 10 мин при 4⁰С. Супернатант, содержащий растворённые белки, был использован для дальнейшего анализа с помощью метода жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Концентрация белка была измерена с использованием Pierce 660 nm protein assay reagent (Thermo scientific). На следующем этапе был проведен денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле толщиной 1 мм с целью концентрирования белковых молекул. Детергентная система состояла из следующих компонентов:

1) Разделительный гель: 12 % акриламид, 1,5 М трис-НСІ-буфер, рН 8,8; 10% додецилсульфат натрия (SDS); 0,025 % N,N,N',N' – тетраметилэтилен диамин (ТЕМЕД); 10 % персульфат аммония.

2) Концентрирующий гель: 4 % акриламид; 0,5 М трис-НСІ-буфер, рН 6,8; 10 % SDS; 0,025 % ТЕМЕД и 10 % персульфат аммония.

3) Электродный буфер содержал 0,01 М трис-HCl; 0,192 М глицин; 1 % SDS, pH 8,3.

Электрофорез был остановлен после того как фронт прошёл 1 см путь в разделяющем геле, так чтобы весь протеом был сконцентрирован между фронтом и границей концентрирующего и разделительного геля. Неразделённую белковую полосу окрашивают с помощью кумасси, вырезают и разделяют на кубики с площадью боковых граней 1 мм². После чего полученные кубики помещают в 96-луночные планшеты и подвергают автоматической обработке в Proteiner DP (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Протокол получения белковых переваров был основан на методике Шевченко с соавторами (Shevchenko, 1996) с незначительными изменениями: гель был промыт сначала 50 мМ раствором бикарбонатом аммония, а потом ацетонитрилом. Далее было проведено восстановление 10 мМ дитиотриитолом в 25 мМ растворе бикарбоната аммония. Алкилирование осуществляли 55 мМ йодацетамидом в 50 мМ растворе бикарбоната аммония. Кусочки геля повторно промывают 50 мМ раствором бикарбоната аммония и ацетонитрилом и сушат в токе N₂. Далее был добавлен трипсин (Proteomics Grade Trypsin, Sigma Aldrich) до конечной концентрации 16 нг/мкл в растворе 25% ацетонитриде/50 мМ бикарбоната аммония, после чего шла инкубация при 37⁰С в течение 4 часов. Реакцию останавливают добавлением 50% ацетонитрила/0.5% трифторуксусной кислоты. Полученные в результате обработки трипсином пептиды высушивают скоростным центрифугированием в вакууме и избавляются от солей с использованием StageTip C18 Pipette tips (Thermo Scientific) до проведения масс-спектрометрического анализа.

Жидкостная хроматография и масс-спектрометрический анализ.

Каждый образец (M=1мкл) 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. В качестве аналитической колонки

использовали обращено-фазную колонку Acquity UPLC M-Class Peptide BEH C18, 75 мкм x 150 мм, размер частиц – 1.7 мкм, размер пор – 130 Å (Waters). В качестве trap-колонки использовали C18 Acclaim PepMap™ 100 (Thermo Scientific), 100 мкм x 2 см, размер частиц – 5 мкм, размер пор – 100 Å, с режимом on-line переключения с аналитической колонки. Загрузочный насос подавал 0.1 % водный раствор муравьиной кислоты со скоростью 2 мкл/мин. Нано-насос обеспечивал скорость потока в 250 нл/мин и работал в градиентных условиях элюирования. Пептиды были разделены в течение 250 мин с использованием градиента подвижной фазы В от 2% до 90% (подвижная фаза А: 2% ацетонитрила и 0.1% муравьиной кислоты; подвижная фаза В: 100% ацетонитрила и 0.1% муравьиной кислоты). Объем инъекции – 5 мкл.

Сбор данных проводился TripleTOF 5600 System (AB SCIEX, Concord, ON). Данные были получены с использованием ISVF 2300 V (ionspray voltage floating), CUR 35 (curtain gas), ИТ 150 (interface heater temperature), GS1 25 (ion source gas 1), DP 100 V (declustering potential). Все данные были обработаны в режиме IDA (information-dependent acquisition) с Analyst TF 1.7 software (SCIEX, USA). Параметры IDA: MS сканирование каждые 0.25 сек в интервале масс 350-1250 Да с последующим 35 MS/MS сканированием каждые 0.1 сек в интервале масс 100-1800 Да.

Анализ данных. Анализ данных, полученных при MS и MS/MS, проводили с помощью Analyst® TF 1.7 Software (SCIEX). С помощью инструментов преобразования файлов данных были созданы mgf файлы, которые были сопоставлены с белковыми базами данных для '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' и *T. uzoniensis* 768-20, содержащих 17964 белок кодирующих генов, с использованием Mascot Server v. 2.5.1 (Matrix Science, London, UK).

2.2.17. Статистическая обработка данных

Статистические анализы выполнены при помощи программного пакета MS Excel 2003.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Характеристика кислых термальных источников, отобранных для измерения активности СРП

В кальдере вулкана Узон и у подножия вулкана Мутновский функционирует большое количество термальных источников, значительно отличающихся друг от друга своими размерами и физико-химическими параметрами. Часть источников функционирует постоянно в течение нескольких лет и даже десятилетий, часть источников являются временными и срок их существования, как правило, не превышает одного года.

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 органических веществ 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°С до 92°С; 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 3. Каждая проба представляла собой смесь осадка и воды в соотношении 1:1. Для большинства источников (кроме 3105М, 3106М и 3105М) был осуществлен гидрохимический анализ состава вод, результаты которого представлены в Приложении в таблицах П1 и П2.

Таблица 3. Основные характеристики источников и результаты измерения потенциальной скорости сульфатредукции в них

Название источника	Координаты источника	Год отбора	Тем-ра, °С	рН	[SO ₄ ²⁻], мг/л	ССР, нмоль S ²⁻ / (см ³ ·сут)
Орешек (№3102М / 3402)	52⁰ 31,818' N 158⁰ 11,499' E 823 м	2014	91	3.5	538	1.094
		2015	92	3.43	309.3	5.49
№ 3105М (Дачные)	52 ⁰ 32,150' N 158 ⁰ 11,653' E 794 м	2014	84	4.1	165	0.083
№ 3106М (Дачные)	52 ⁰ 32,454' N 158 ⁰ 11,083' E 796 м	2014	91	3.2	15	0.054
Подкаменный (№3408)	52⁰ 32.087' N 158⁰ 11.851' E 794 м	2015	60	5.57	101.3	2.231
№ 3105U (Оранжевое поле)	54 ⁰ 30,384' N 160 ⁰ 00,087' E 661 м	2014	65	4.0	433	0.147
№ 3112U / 3412 (Оранжевое поле)	54 ⁰ 30,413' N 160 ⁰ 00,043' E 663 м	2014	83	3.0	635	0.110
		2015	82	2.5	951.2	0.015
Нефтяная площадка (№3427)	54⁰ 30,023' N 160⁰ 00,088' E 654 м	2015	60	4.2	220	12.900
№3420 (Западное поле)	54 ⁰ 30.035' N 159 ⁰ 56.836' E 709 м	2015	70	3	701	0.027
№3423 (Западное поле)	54 ⁰ 30.009' N 159 ⁰ 56.983' E 709 м	2015	72	5	262	0.027
Солнечный (№3424)	54⁰ 29.941' N 159⁰ 59.530' E 657м	2015	52	6.1	58	2.421

Полужирным шрифтом выделены источники для которых была показана активность СРП.

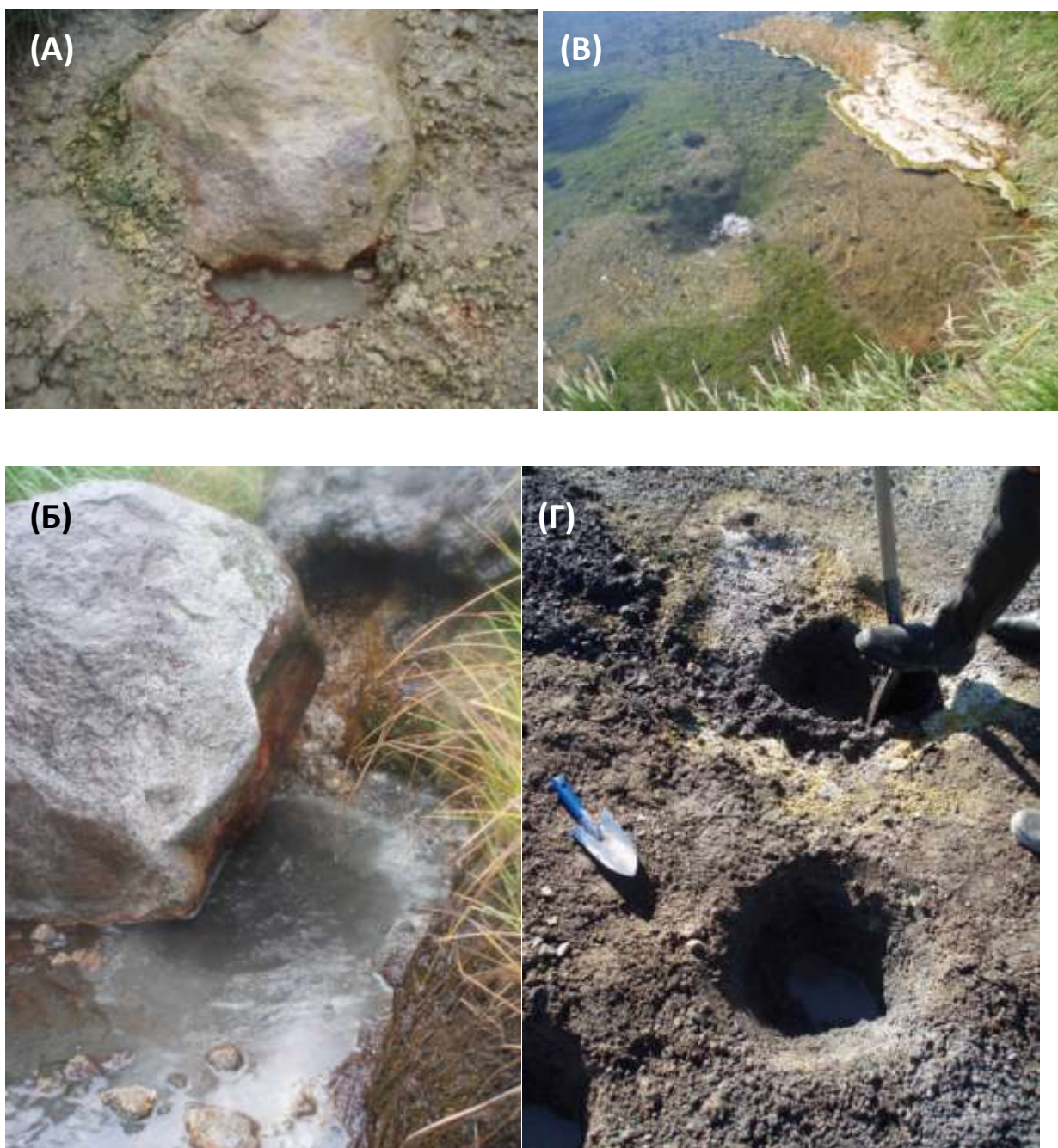


Рис. 1. Фотографии источников отбора проб:

- (А) Источник Орешек, Активная площадка, подножие вулкана Мутновский;
- (Б) Источник Подкаменный, площадка Группа источников Дачные, подножие вулкана Мутновский;
- (В) Источник Солнечный, Центральное поле, кальдера Узон;
- (Г) Отбор почвенной пробы с Нефтяной площадки, Центральное поле, кальдера Узон.

3.2. Активность СРП в источниках

С помощью радиоизотопного метода была определена потенциальная скорость сульфатредукции в пробах. Результаты измерений представлены в таблице 3. Значения скоростей, достоверно указывавших на процесс сульфатредукции, были получены для проб из источников Орешек, Подкаменный, Солнечный и почвенной пробы с Нефтяной площадки. В источнике Орешек измерения проводили в 2014 году, когда скорость сульфатредукции составила $1.094 \text{ нмоль } S^{2-}/(\text{см}^3 \cdot \text{сут})$, а также в 2015 году, когда интенсивность процесса возросла, и было получено значение в $5.49 \text{ нмоль } S^{2-}/(\text{см}^3 \cdot \text{сут})$. Наибольшая активность СРП была измерена в почвенной пробе с Нефтяной площадки и составила $12.9 \text{ нмоль } S^{2-}/(\text{см}^3 \cdot \text{сут})$. Для источников 3408 и Солнечный были получены схожие цифры - 2.231 и $2.421 \text{ нмоль } S^{2-}/(\text{см}^3 \cdot \text{сут})$ соответственно. Для источника Орешек и почвенной пробы с Нефтяной площадки была определена интенсивность ассимиляции CO_2 , которая в составила 7.56 и $1.44 \text{ нмоль } \text{CO}_2/(\text{мл} \cdot \text{сут})$ соответственно.

Исследовано влияние ряда субстратов (дрожжевой экстракт, лактат, ацетат, этанол, метанол и H_2) на скорость сульфатредукции (рис. 2). 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. Добавление этанола способствовало увеличению скорости сульфатредукции в 26.8 раза, дрожжевого экстракта в 8.1 раза, водорода в 11 раза, лактата в 5.8 раза и ацетата в 1.9 раза. На активность СРП в почвенной пробе с Нефтяной площадки наибольшее стимулирующее действие оказало добавление водорода и дрожжевого экстракта. Интенсивность сульфатредукции возросла в 10.6 и 7.6 раза соответственно. Незначительное увеличение скорости сульфатредукции происходило при добавлении этанола, добавление лактата и ацетата не оказало влияние на интенсивность процесса,

метанол оказывал ингибирующее влияние. Для пробы из источника Солнечный было показано стимулирующее действие всех без исключения субстратов. Дрожжевой экстракт увеличивал скорость сульфатредукции в 18.8 раза, этанол в 17.2 раза, ацетат в 13.8 раза, водород в 10 раз, лактат в 8.5 раза и метанола в 3.6 раза.

Аналогичный эксперимент был поставлен и для проб, в которых сульфатредукции не была обнаружена. Для пробы 3423, отобранной на Западном поле кальдеры вулкана Узон, добавление лактата позволило выявить активность СРП, которая составила 3.1 нмоль $S^{2-}/(см^3 \cdot сут)$.

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

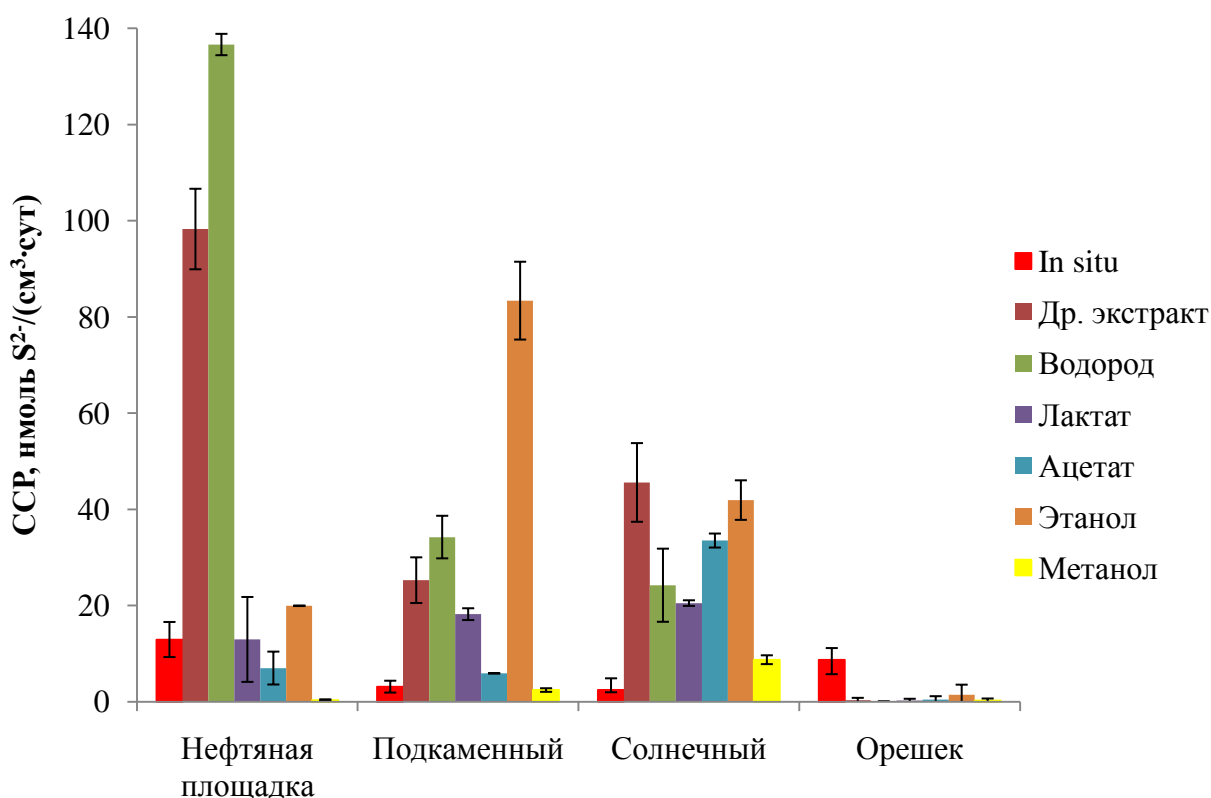


Рис. 2. Влияние разных субстратов на скорость сульфатредукции. На диаграмме представлены результаты, полученные вычислением среднего значения по 3-м повторностям.

3.3. 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 при 60°C и pH 4.8 были получены одиночные колонии красно-коричневого 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).

3.3.1. Морфология штамма 3127-1^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. 3А). Ультратонкие срезы клеток штамма 3127-1^T показали наличие грамтрицательной клеточной стенки с внешней мембраной (рис. 3Б). Внутриклеточных включений и мембран обнаружено не было.

3.3.2. Характеристики роста штамма 3127-1^T

Штамм 3127-1^T являлся облигатным анаэробом, рост которого был показан исключительно на восстановленной сульфидом среде, умеренным

термофилом с ростом в диапазоне 37–65°C и оптимумом 54°C, умеренным ацидофилом с ростом в интервале pH 3.7–6.5 и оптимумом при 4.8–5.0 (рис. 4).

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.

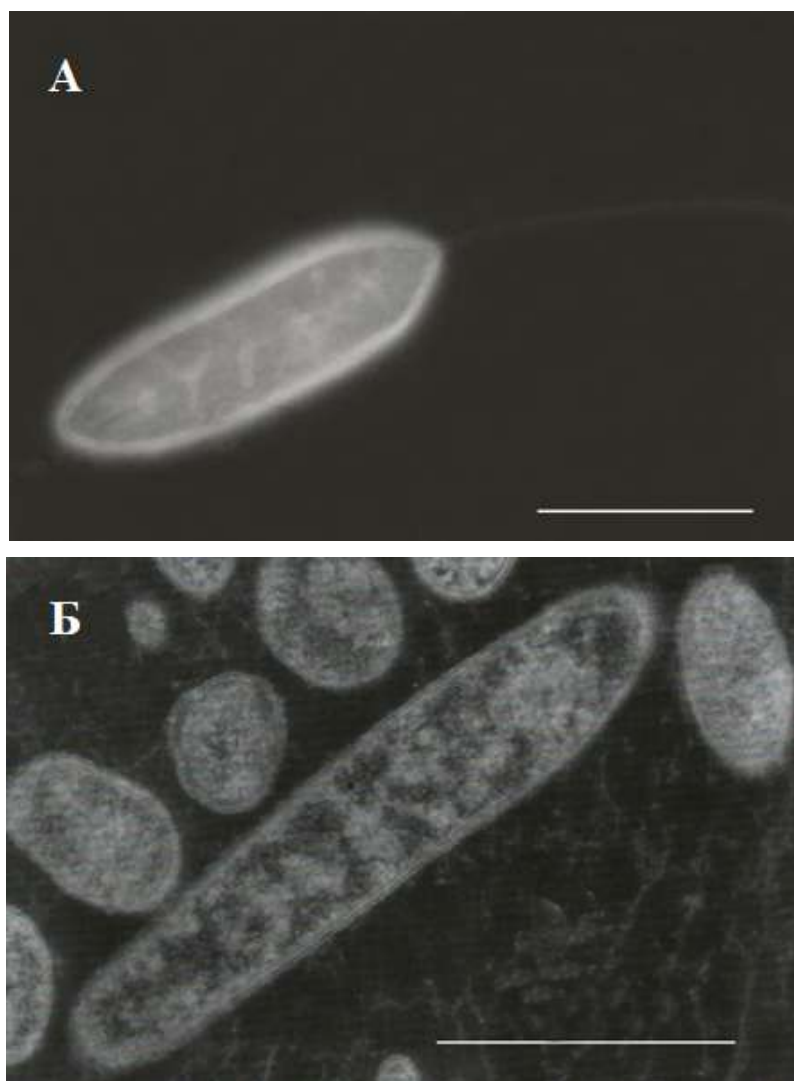


Рис. 3. Морфология и ультраструктура клеток *Thermodesulfobium acidiphilum* 3127-1^T: (А) электронная микроскопия, препараты целых клеток (окраска фосфовольфрамовой кислотой), масштаб – 1 мкм; (Б) электронная микроскопия, ультратонкие срезы (окраска уранилацетатом), масштаб – 1 мкм.

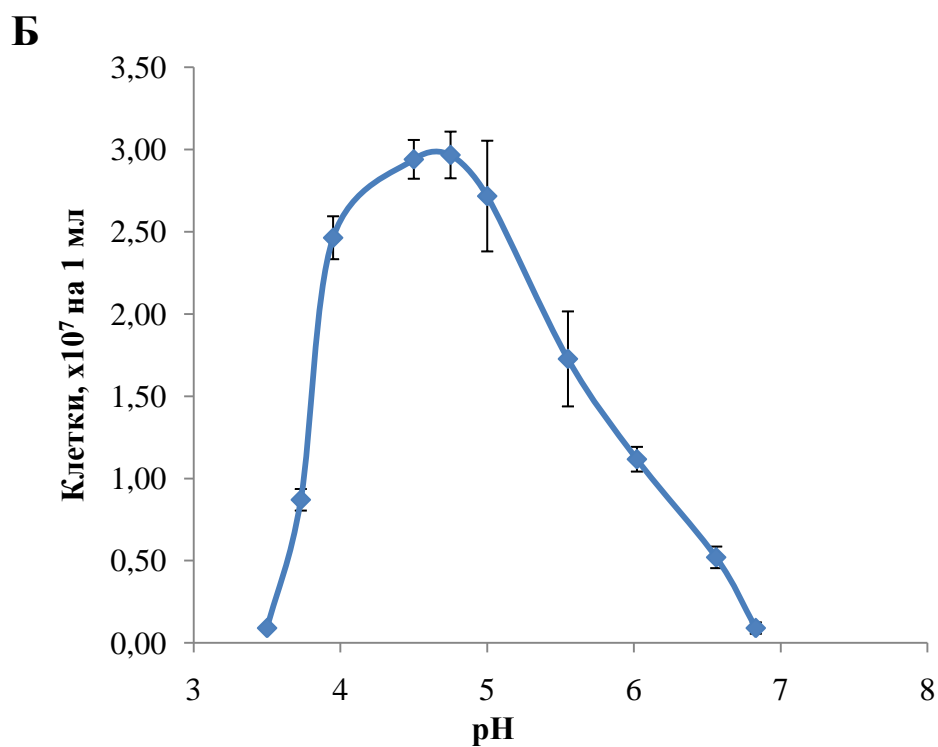
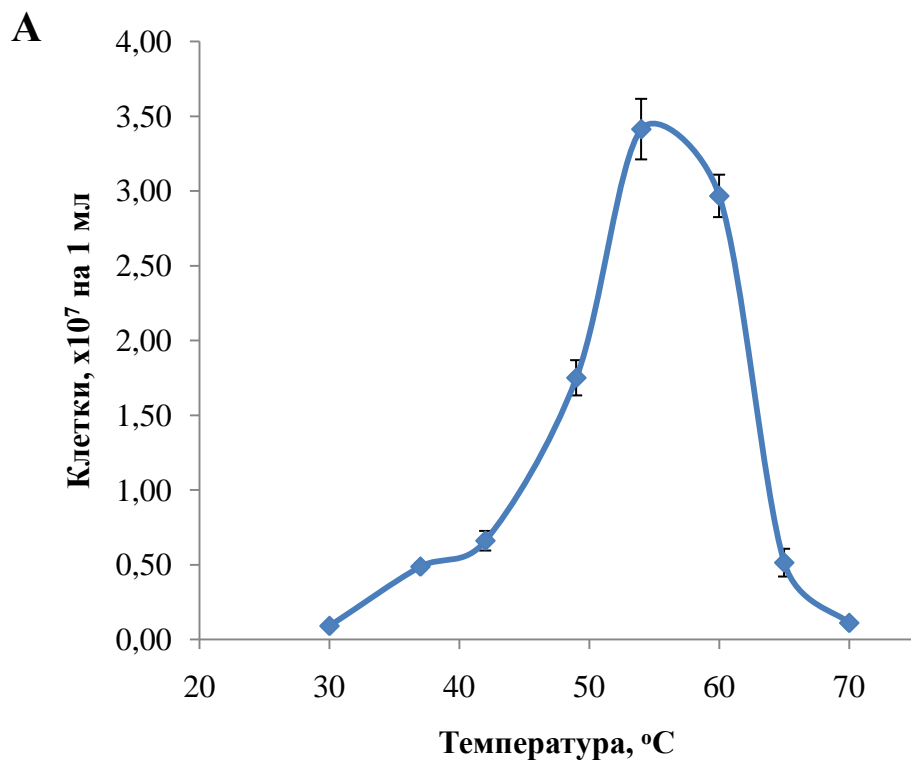


Рис. 4. Влияние температуры (А) и рН (Б) на рост штамма 3127-1^Т. На графиках представлены результаты, полученные вычислением среднего значения по 3-м повторностям.

3.3.3. Метаболизм штамма 3127-1^T

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. 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 О₂ в качестве акцепторов электронов.

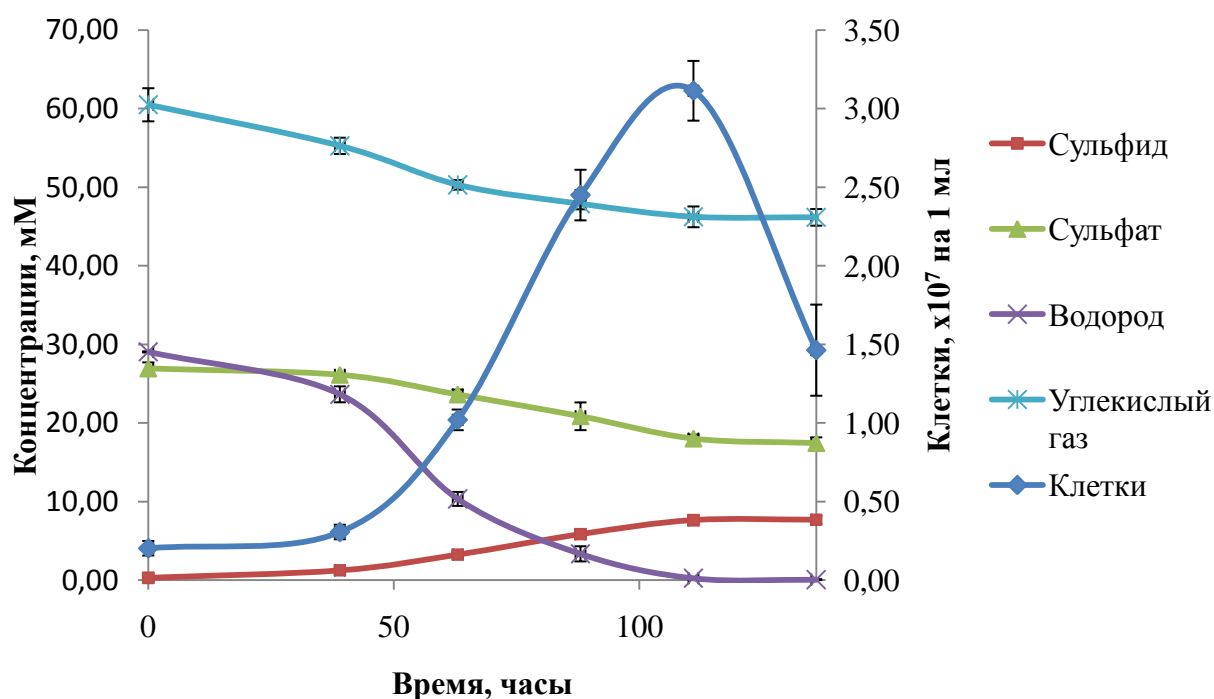


Рис. 5. Кривая роста *Thermodesulfobium acidiphilum* 3127-1^T. На графике представлены результаты, полученные вычислением среднего значения по 3-м повторностям.

3.3.4. Отношение к антибиотикам штамма 3127-1^T

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).

3.3.5. Состав жирных кислот, липидов мембран и хинонов у штамма 3127-1^T

Анализ состава жирных кислот клетки показал, что C16:0 является мажорным компонентом, на долю которого приходится 42.4% от общего количества жирных кислот. Кроме того были детектированы следующие жирные кислоты: C18:0 (18.8%), C19:0_{сус} (13.6%), C21:0_{сус} (4.9%), C20:0 (4.9%), C12:0 (4.7%), C18:1 ω 9 (4.2%), C14:0 (3.4%), C22:0 (2.1%), C10:0 (0.5%), C15:0 (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.

3.3.6. Геносистематические характеристики штамма 3127-1^T

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).

Сравнение белков, закодированных в геномах штамма 3127-1^T и *Th. narugense* Na82^T, было осуществлено после их аннотации в RAST (Overbeek *et al.*, 2014), с использованием SEED (Overbeek *et al.*, 2014) Sequence Based Comparison tool. Анализ показал среднее значение идентичности аминокислотных последовательностей белков, общих для обоих микроорганизмов, на уровне 90%. Около 5% белков закодированных в геноме штамма 3127-1^T и около 8% белков закодированных в *Th. narugense* Na82^T не имели гомологов в сравниваемом геноме.

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. 6).

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. На основании вышеприведённых результатов нами был предложен новый вид *Thermodesulfobium acidiphilum*. Диагноз вида представлен в разделе Приложение.

3.4. 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.

3.4.1. Морфология штамма 3408-1^T

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 изолят был способен образовывать круглые терминальные эндоспоры после 7 суток инкубации, однако, число спорообразующих клеток было невелико и обычно не превышало 2-3 %.

3.4.2. Характеристики роста штамма 3408-1^T

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 был умеренным термофилом, который рос в диапазоне 42–70°C с оптимумом 55°C, и умеренным ацидофилом с ростом в интервале pH 2.9–6.5 с оптимумом при 4.5 (рис. 7). 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.

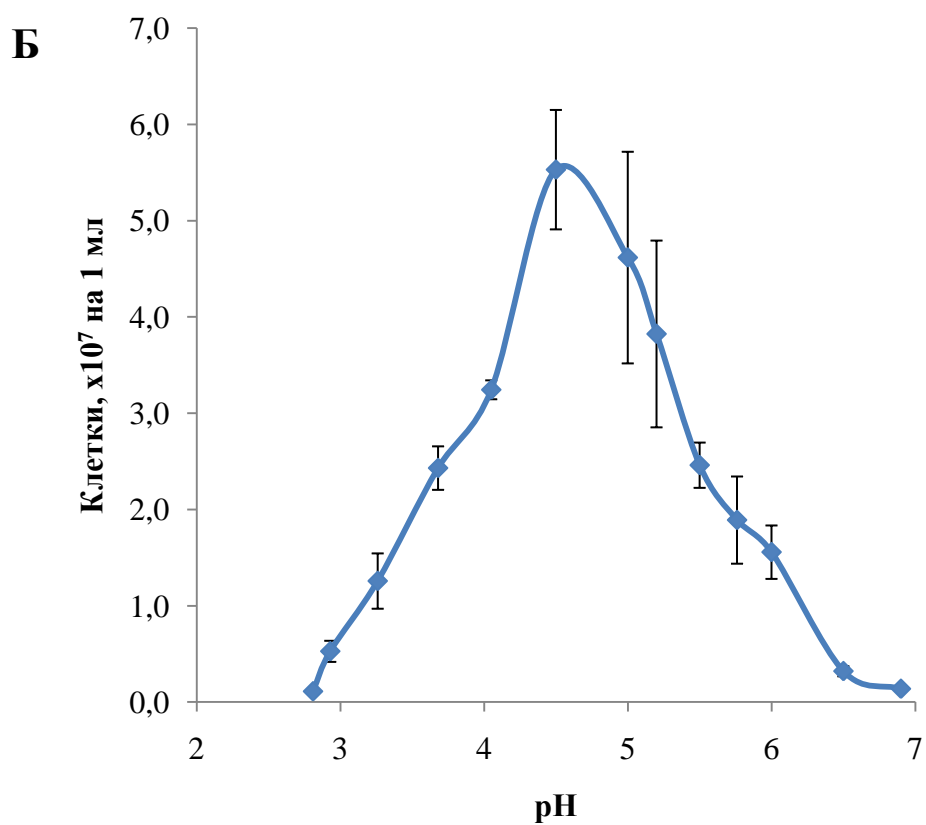
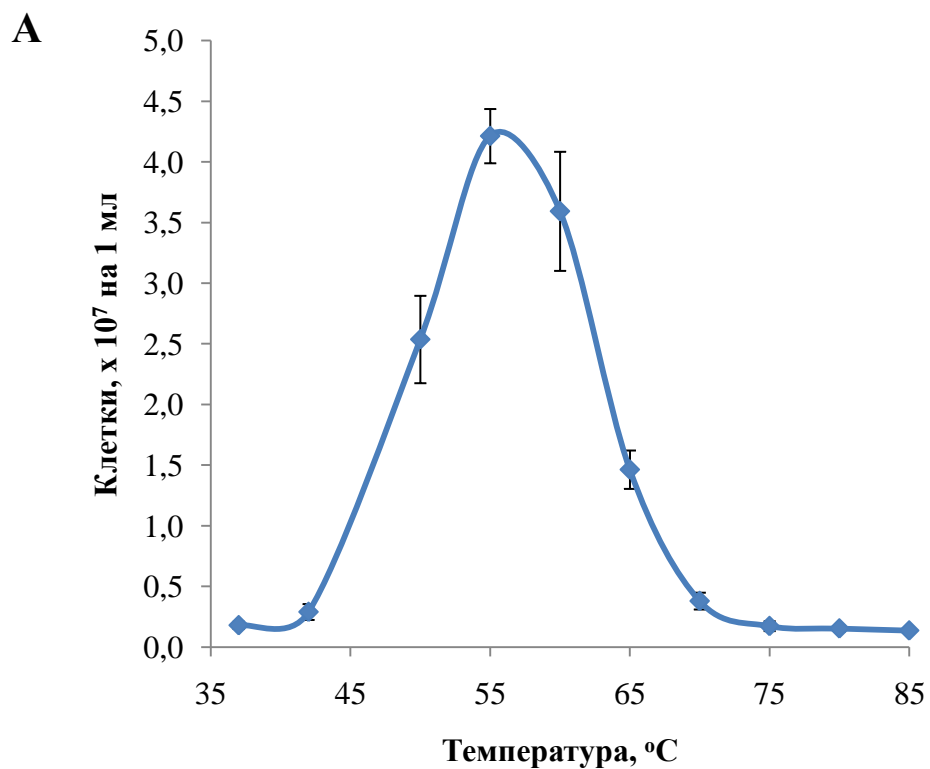


Рис. 7. Влияние температуры (А) и pH (Б) на рост штамма 3408-1^T. На графиках представлены результаты, полученные вычислением среднего значения по 3-м повторностям.

3.4.3. Метаболизм штамма 3408-1^T

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. 8). В качестве альтернативных субстратов для сульфатредукции штамм 3408-1^T использовал 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 (5 мМ), 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.

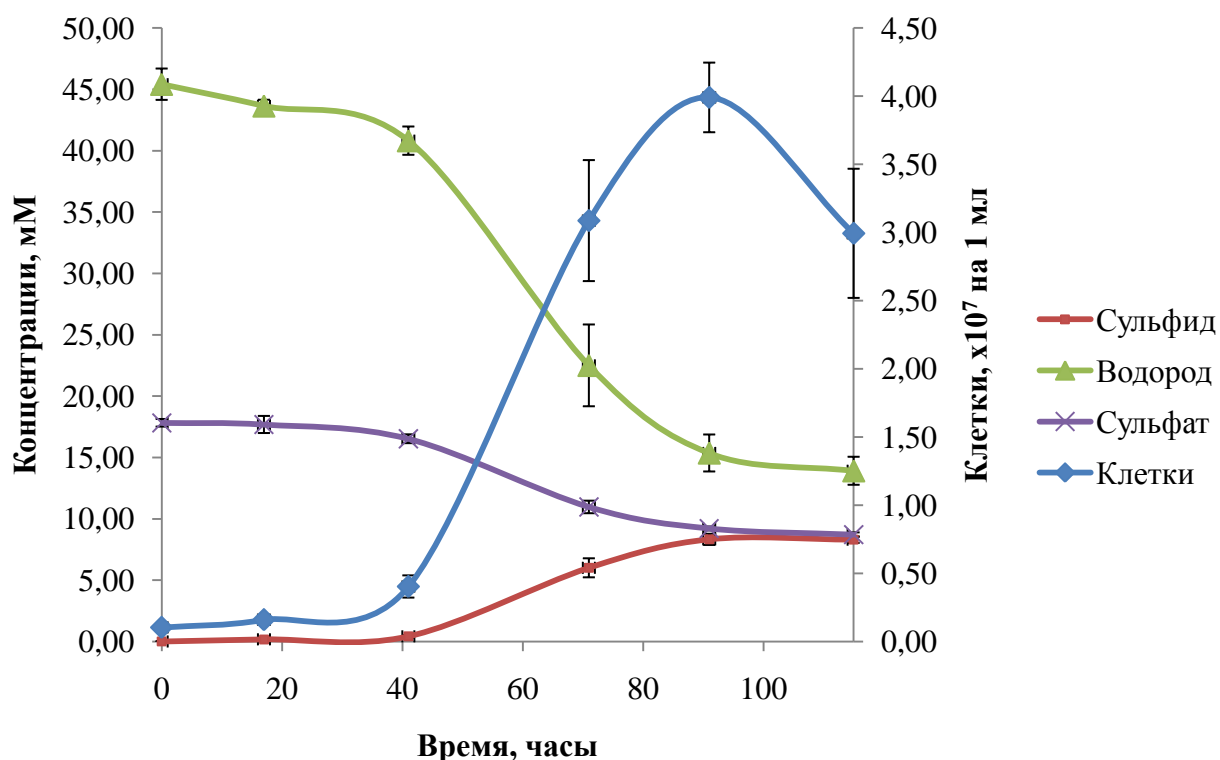


Рис. 8. Рост штамма 3408-1^T в присутствии водорода и сульфата. На графике представлены результаты, полученные вычислением среднего значения по 3-м повторностям.

3.4.4. Отношение к антибиотикам штамма 3408-1^T

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).

3.4.5. Состав жирных кислот, липидов мембран и хинонов у штамма 3408-1^T

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%). Полярные липиды мембран были представлены неидентифицированными фосфогликолипидами. Доминирующим хиноном был МК-7.

3.4.6. Геносистематические характеристики штамма 3408-1^T

Филогенетический анализ показал, что организм 3408-1^T относится к семейству *Thermoanaerobacteraceae* и наиболее близок к представителям рода *Ammonifex* (рис. 9). Однако, последовательность гена 16S рРНК 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*'. Диагноз вида представлен в разделе Приложение.

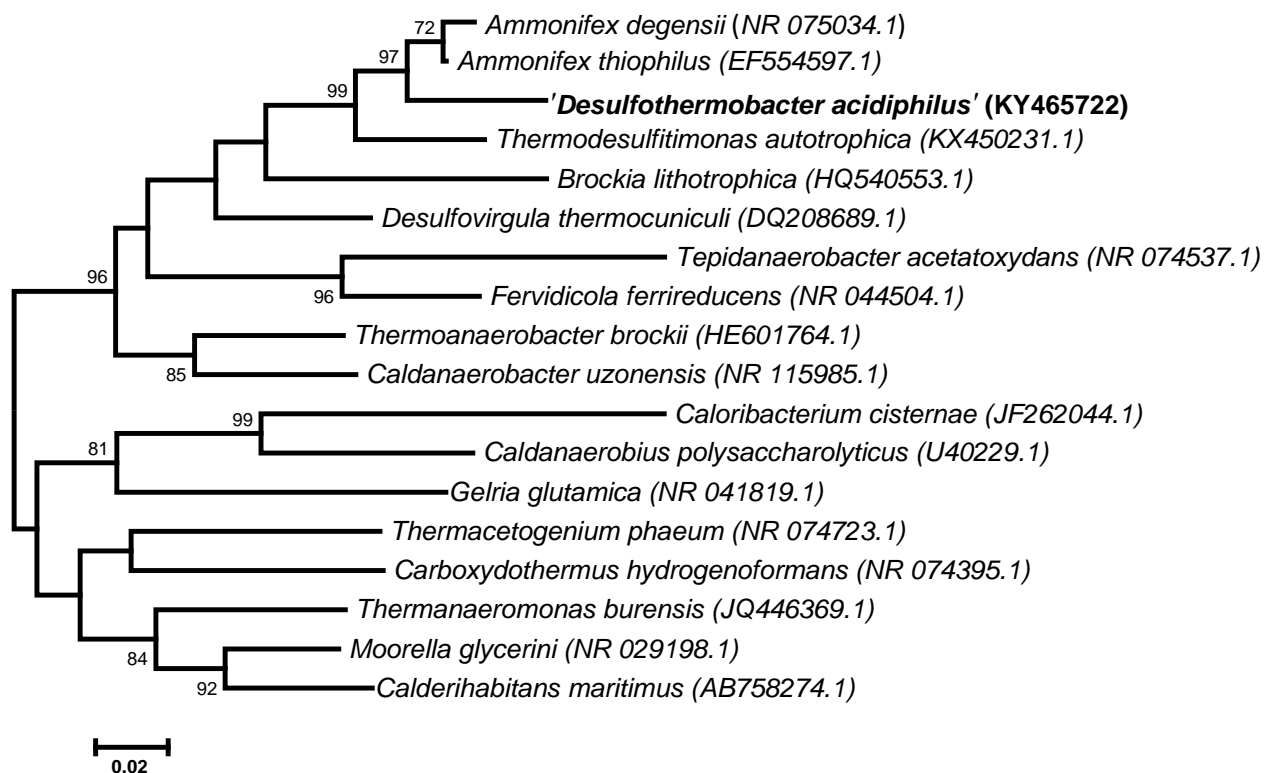


Рис. 9. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе сравнения последовательностей гена 16S рНК штамма 3408-1^T и некоторых родственных видов в семействе *Thermoanaerobacteraceae*.

3.5. 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.

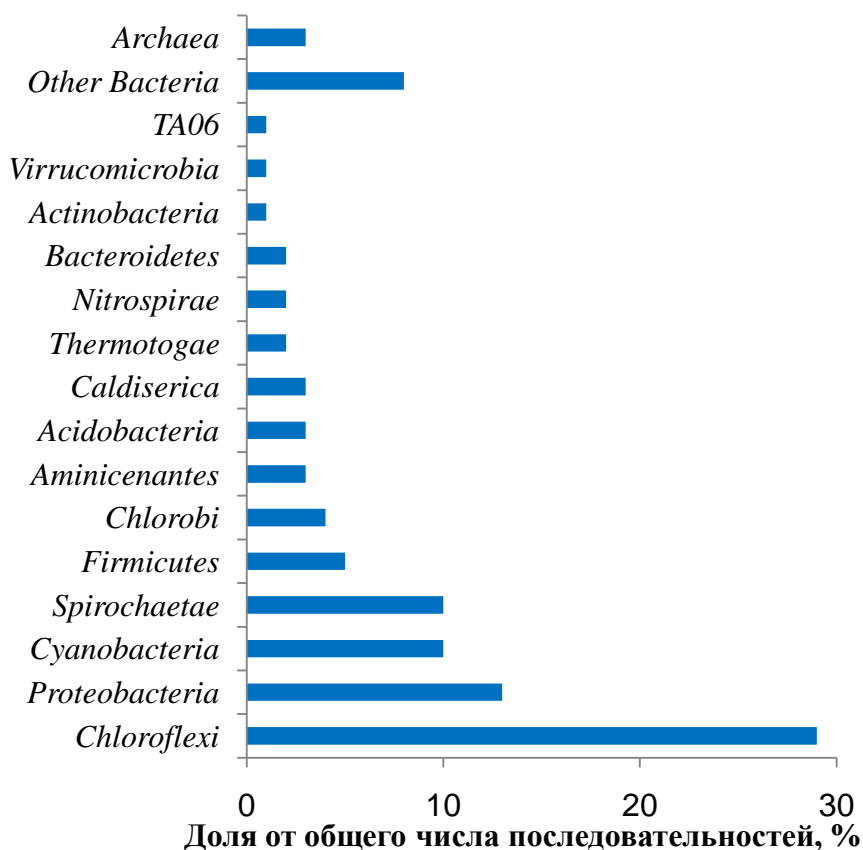


Рис. 10. Состав микробного сообщества источника Солнечный.

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.

3.6. Анализ состава микробного сообщества в источнике Орешек

Для анализа состава микробного сообщества в источнике Орешек в результате секвенирования было получено 473524 последовательности гена 16S рРНК 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 все основные группы микроорганизмов были идентифицированы.

Основу микробного сообщества в источнике Орешек составляли археи, так как на долю последовательностей архей в полученной библиотеке генов 16S рРНК 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.

3.7. Анализ состава микробного сообщества в источнике 3423 на Западном поле в кальдере вулкана Узон

В результате высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК 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 рРНК из источника 3423 последовательности архей составляют 97.43%, в то время как на долю последовательностей бактерий приходилось 1.99%. Для 0.58% последовательностей не удалось определить их принадлежность. 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).

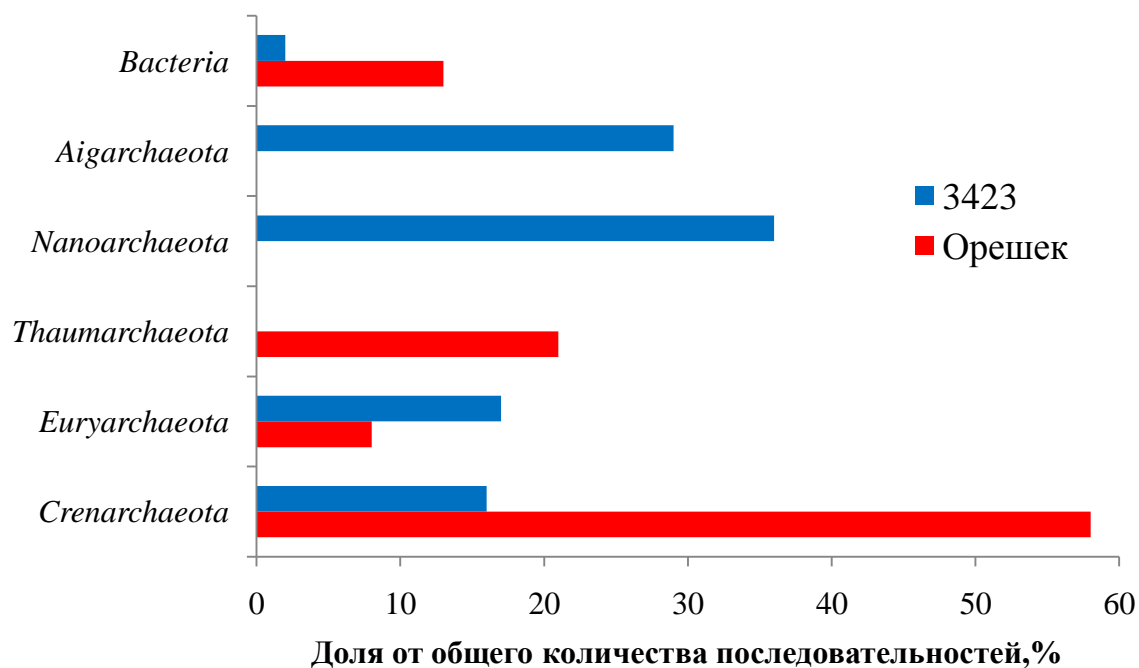


Рис. 11. Состав микробных сообществ из источников Орешек и 3423.

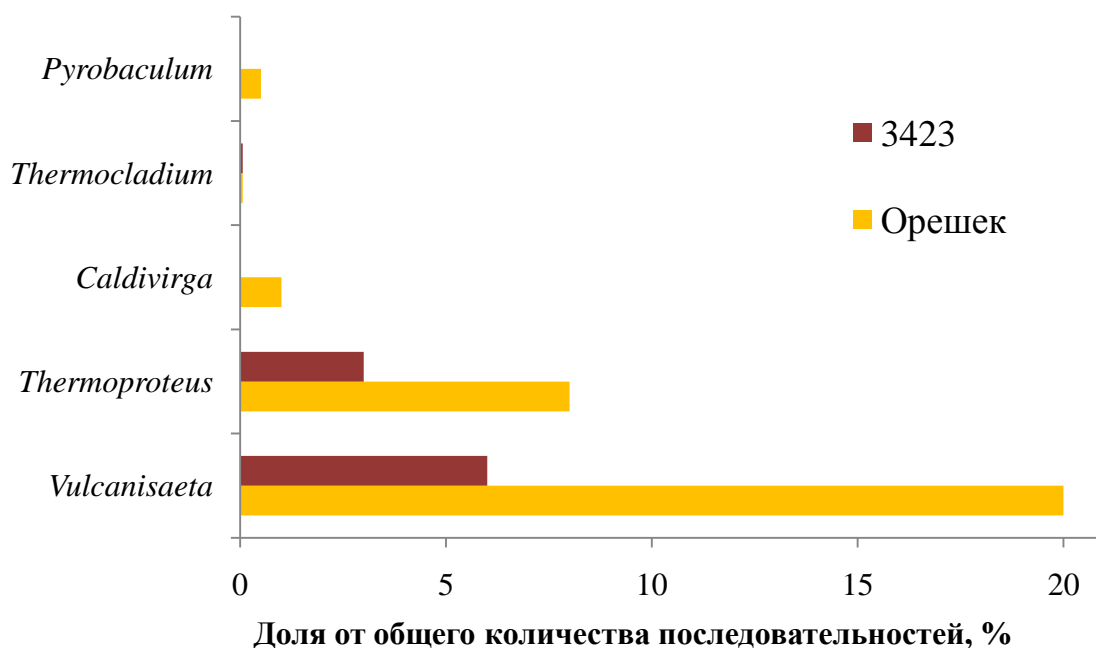


Рис. 12. Состав семейства *Thermoproteaceae* в источниках Орешек и 3423

3.8. 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 эквимольным 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 сбразиванию органических субстратов.

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

3.9. 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.

3.9.1. Геномный анализ

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* (рис.13). 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 (Klein *et al.*, 2001).

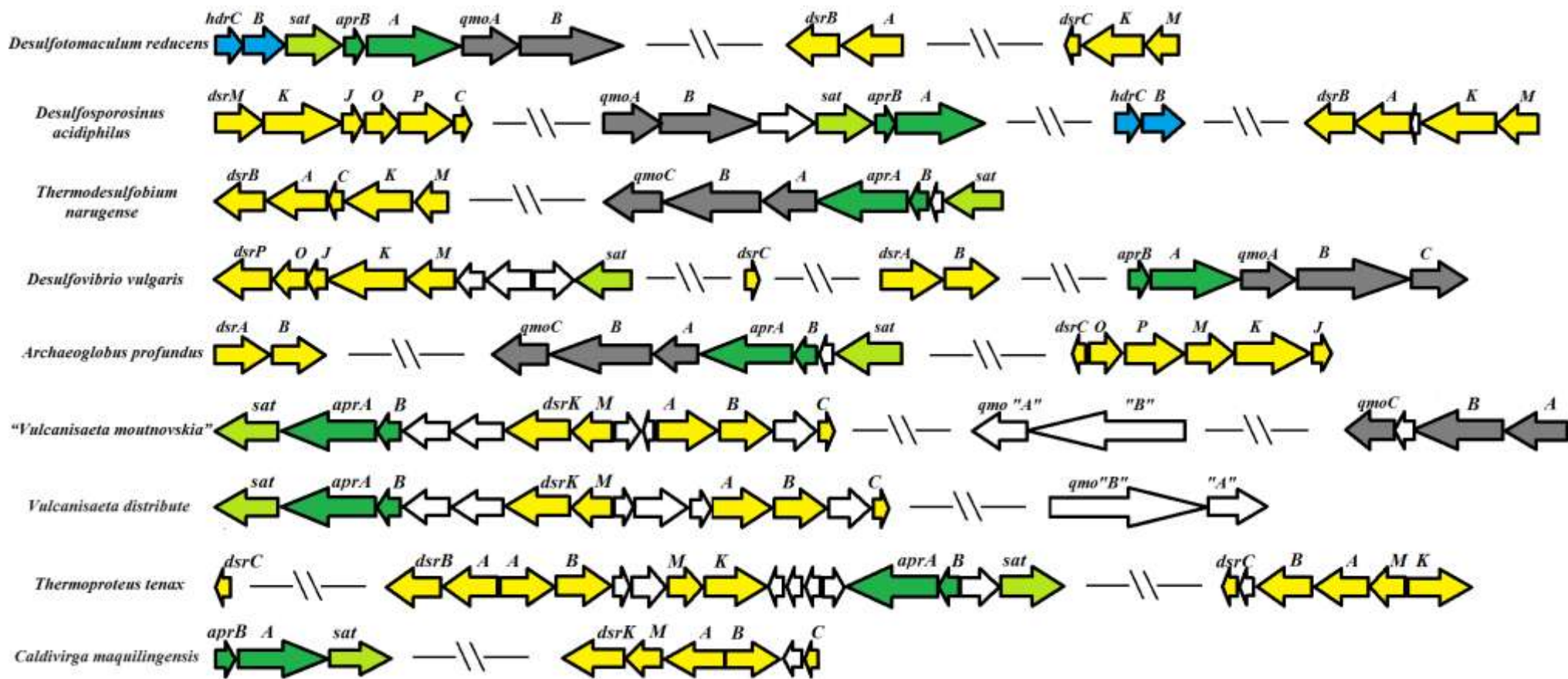


Рис. 13. Кластеризация генов сульфатредукции (*dsr*, *sat*, *apr* и *qmo*) у 'Candidatus V. moutnovskia 768-28', *V. distribute*, *T. tenax*, *C. maquilingensis* и некоторых сульфатредукторов.

3.9.2. Филогенетический анализ ключевых генов сульфатредукции

Филогенетический анализ генов *dsrAB* из баз данных NCBI показал (рис. 14 и 15), 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.

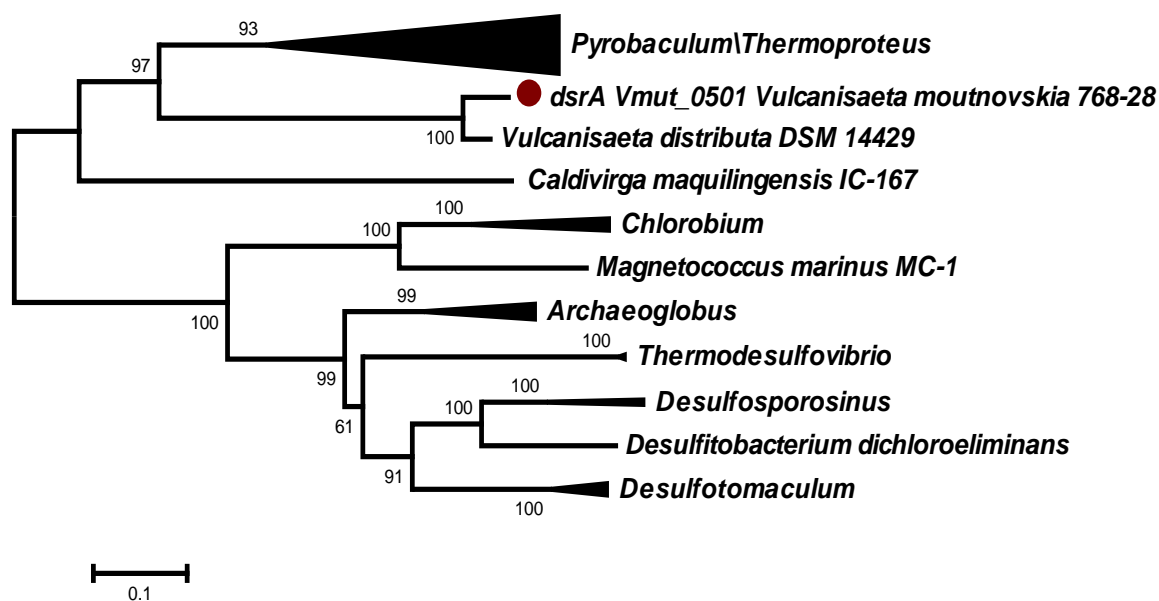


Рис. 14. Филогенетическое дерево, построенное на основании анализа аминокислотных последовательностей DsrA у сульфатредуцирующих архей (*Archaeoglobus* и '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28') и бактерий. Видно, что последовательность гена *dsrA* представителей рода *Archaeoglobus* находится в бактериальном кластере.

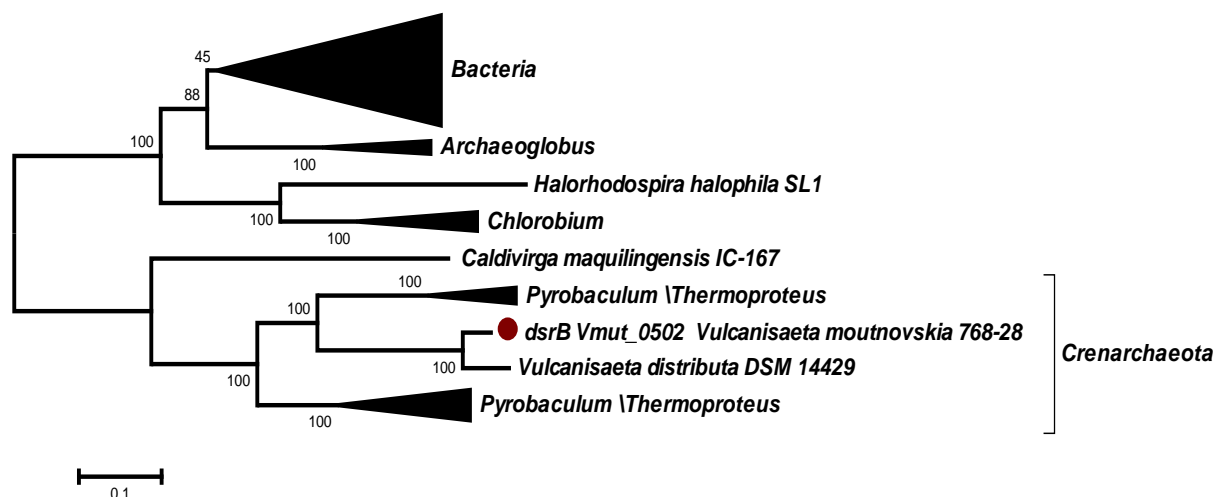


Рис. 15. Филогенетическое дерево, построенное на основании анализа аминокислотных последовательностей DsrB у сульфатредуцирующих архей (*Archaeoglobus* и '*Candidatus V. moutnovskia 768-28*') и бактерий. Видно, что последовательность гена *dsrB* представителей рода *Archaeoglobus* находится в бактериальном кластере.

3.9.3. Культивирование коллекционных культур

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 увенчались успехом. Неоднократные попытки разделения '*Candidatus V. moutnovskia 768-28*' и *T. uzoniensis 768-20* также не дали желаемого результата.

Бинарная культура росла в интервале температур от 65 до 98°C с оптимумом при 85°C (рис. 16) и в интервале pH от 3.8 до 6.0 с оптимумом 4.8-5.0 (рис.17). Нами была показана зависимость роста от концентрации сульфата

в среде, когда добавление 7.5 мМ сульфата способствовало увеличению прироста биомассы в 3 раза (рис. 18). Рост бинарной культуры сопровождался образованием 2 мМ сульфида и эквивалентным потреблением сульфата (рис. 19). Культура была способна к использованию серы вместо сульфата в качестве терминального акцептора электронов (рис. 20). 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 составляет 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.

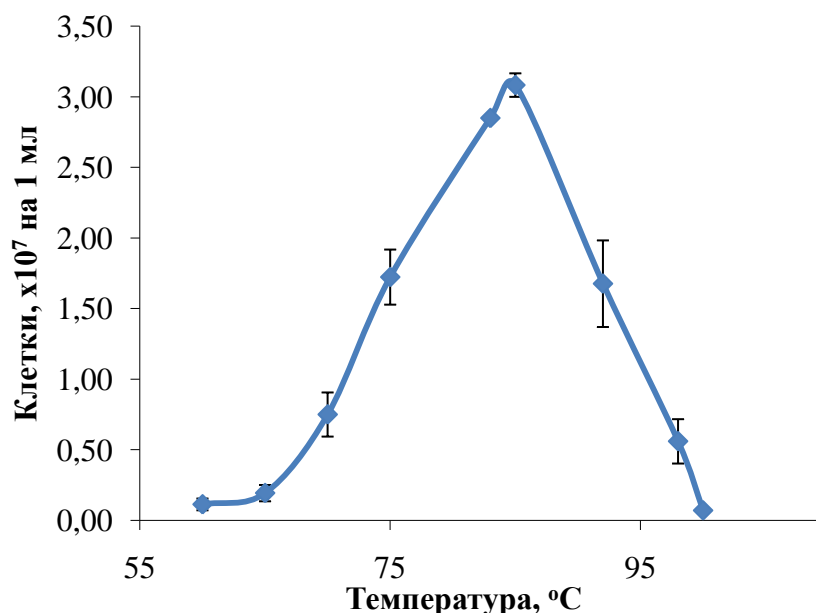


Рис. 16. Влияние температуры на рост бинарной культуры ('*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' и *T. uzoniensis* 768-20) на сульфатной среде. На графике представлены результаты, полученные вычислением среднего значения по 3-м повторностям.

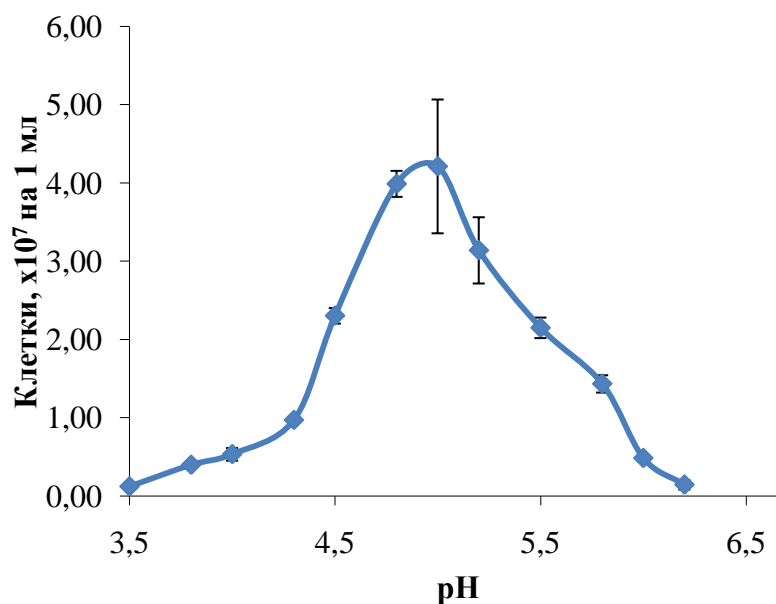


Рис. 17. Влияние pH на рост бинарной культуры ('*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' и *T. uzoniensis* 768-20) на сульфатной среде. На графике представлены результаты, полученные вычислением среднего значения по 3-м повторностям.

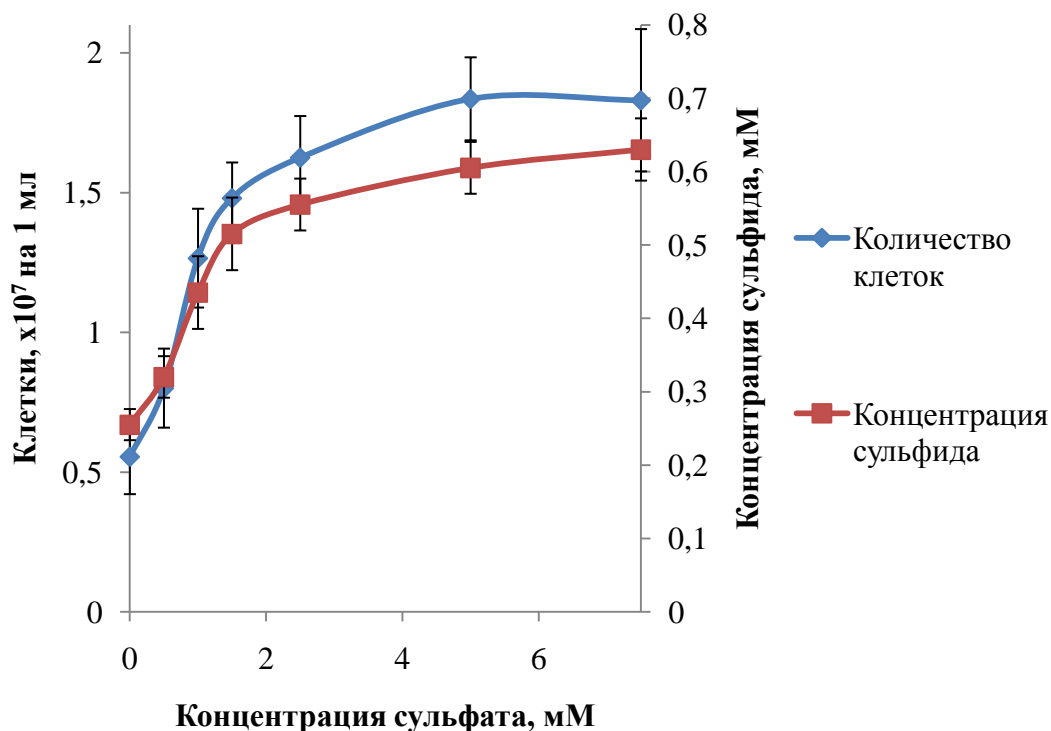


Рис. 18. Зависимость роста бинарной культуры ('*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' и *T. uzoniensis* 768-20) от концентрации сульфата. На графике представлены результаты, полученные вычислением среднего значения по 3-м повторностям.

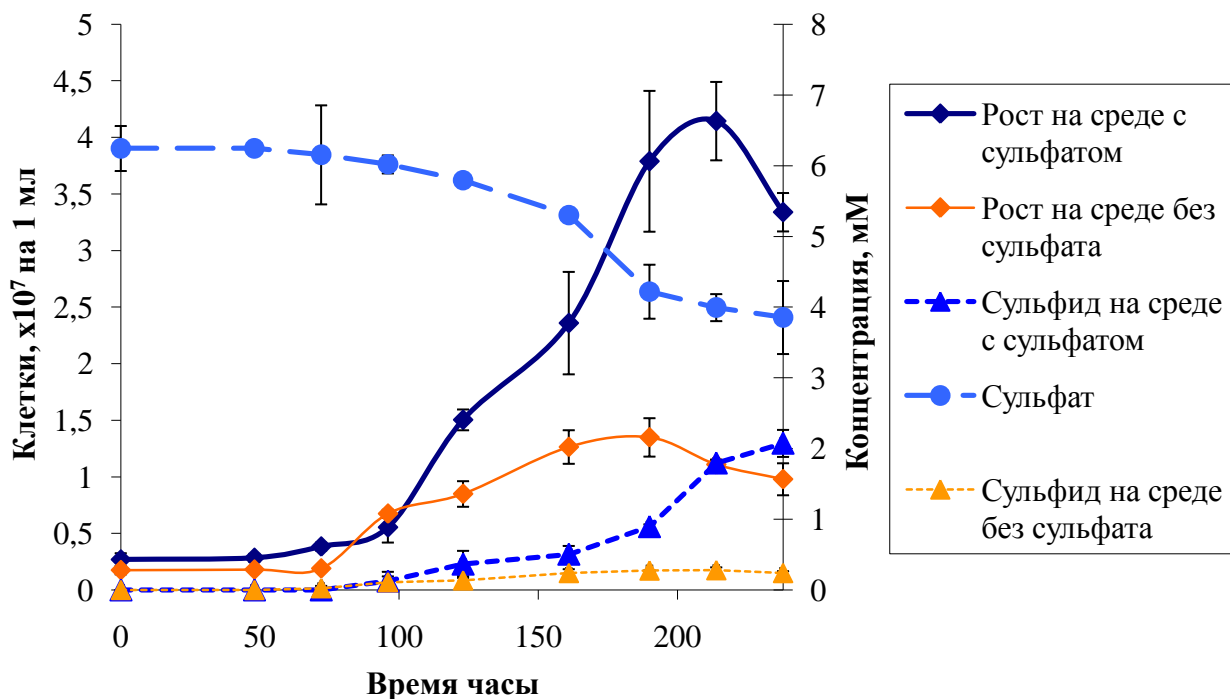


Рис. 19. Сульфидогенный рост бинарной культуры ('*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' и *T. uzoniensis* 768-20) на сульфатной среде. На графике представлены результаты, полученные вычислением среднего значения по 3-м повторностям.

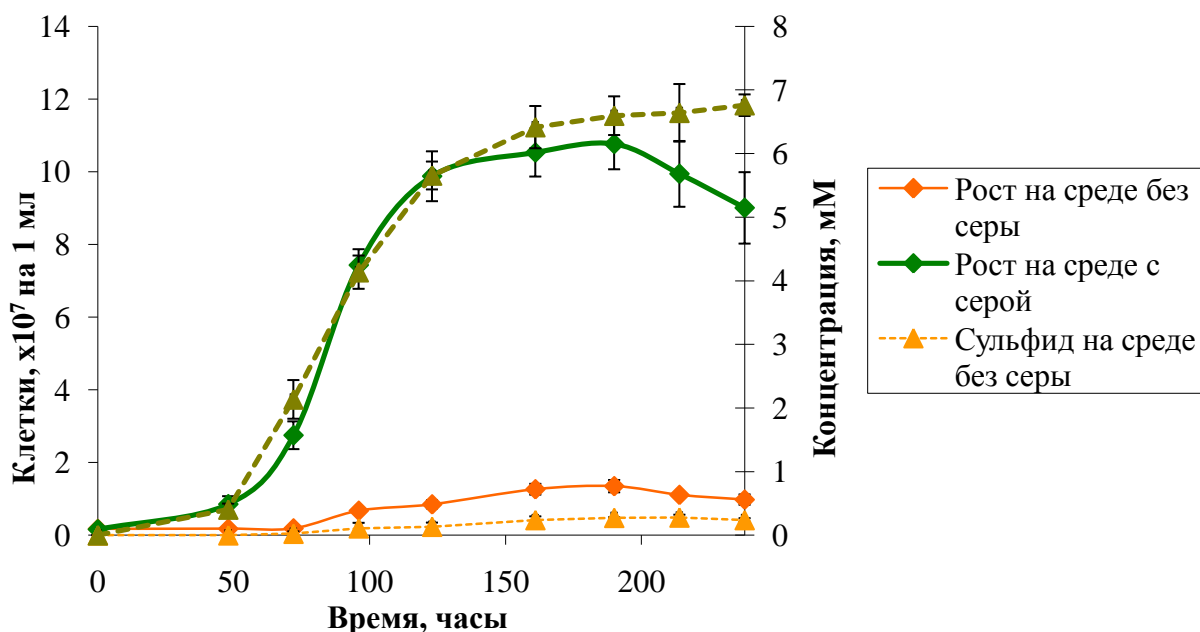


Рис. 20. Рост бинарной культуры ('*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' и *T. uzoniensis* 768-20) на среде с серой в качестве терминального акцептора электронов. На графике представлены результаты, полученные вычислением среднего значения по 3-м повторностям.

3.9.4. Радиоизотопные исследования с использованием $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$

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. 21).

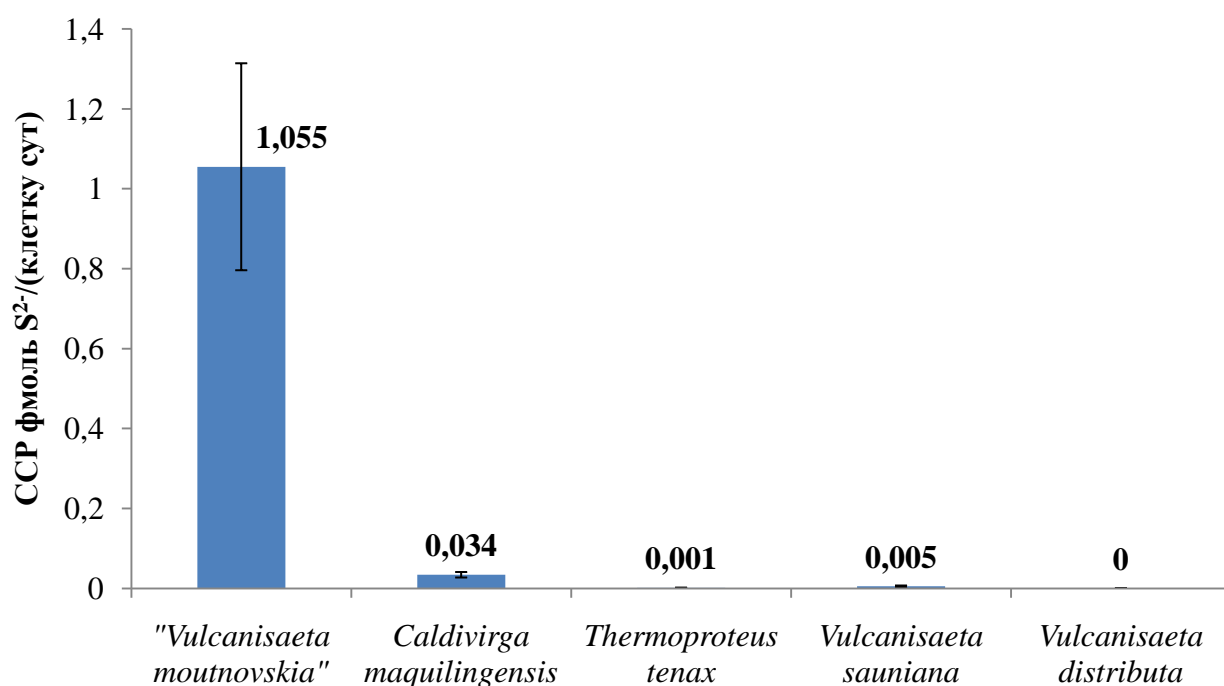


Рис. 21. Скорость сульфатредукции у '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28', *T. tenax*, *V. distribute*, *V. souniana* и *C. maquilingensis*. На диаграмме представлены результаты, полученные вычислением среднего значения по 3-м повторностям.

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 элементарную серу (10 г/л). Показано, что добавление элементарной серы снижает интенсивность сульфатредукции более чем в 54 раза (рис. 22), тем самым процесс сульфатредукции практически прекращается. Таким образом, сера является более предпочтительным акцептором электронов для '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28'.

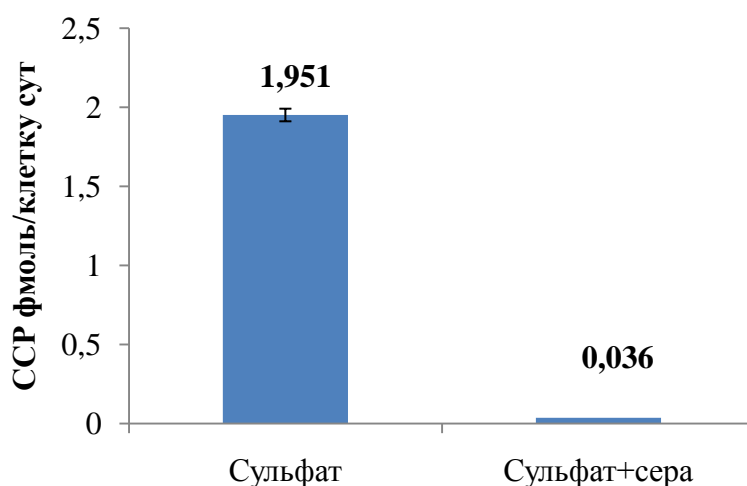


Рис. 22. Интенсивность сульфатредукции бинарной культуры ('*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' и *T. uzoniensis* 768-20) на среде с сульфатом и среде, содержащей как сульфат, так и элементарную серу в качестве акцепторов электронов. На диаграмме представлены результаты, полученные вычислением среднего значения по 3-м повторностям.

3.9.5. Анализ протеома бинарной культуры

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 элементарную серу (рис. 23 и 24). 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, участвующих в сульфатредукции, присутствуют при культивировании бинарной культуры на сульфатной среде и закодированы в геноме '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' (табл. 4). Важно отметить, что Sat, DsrA, DsrB и AprA относятся к числу наиболее многочисленных белков клетки (рис. 23А). 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' (рис. 23Б).

Табл. 4. Результаты анализа протеома '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' и *T. uzoniensis* 768-20 по ключевым белкам сульфатредукции

Белок	% от общего количества белков			
	Акцептор - SO ₄ ²⁻		Акцептор - 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				

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 (рис. 24).

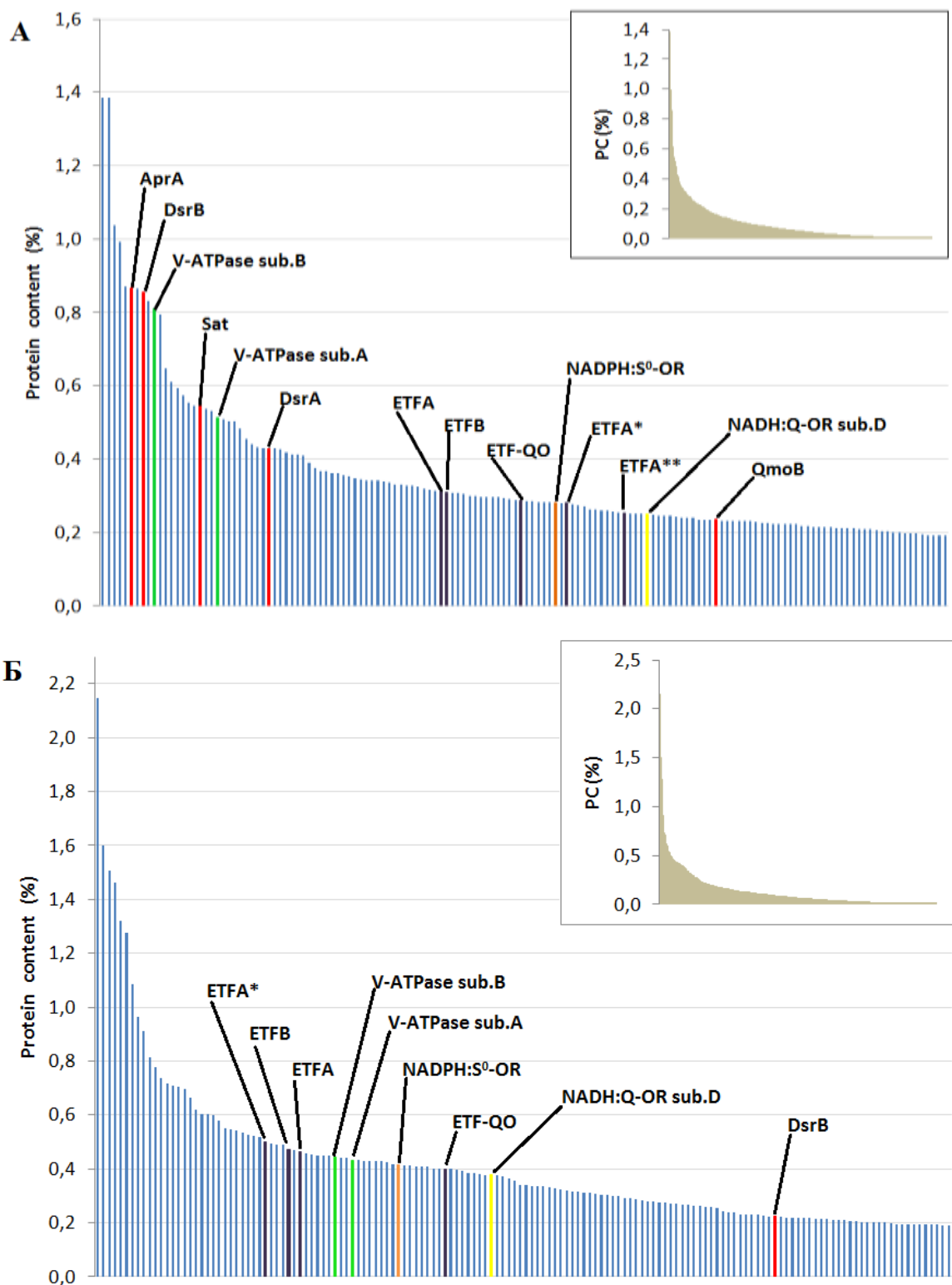


Рис. 23. Обзор результатов протеомного анализа '*Candidatus V. moutnovskia 768-28*' на среде с сульфатом (А) и с элементной серой (Б). Белки расположены в соответствии с их относительным содержанием в каждом образце (вложенные графики в верхнем правом углу), а 150 наиболее многочисленных белков проанализированы более подробно.

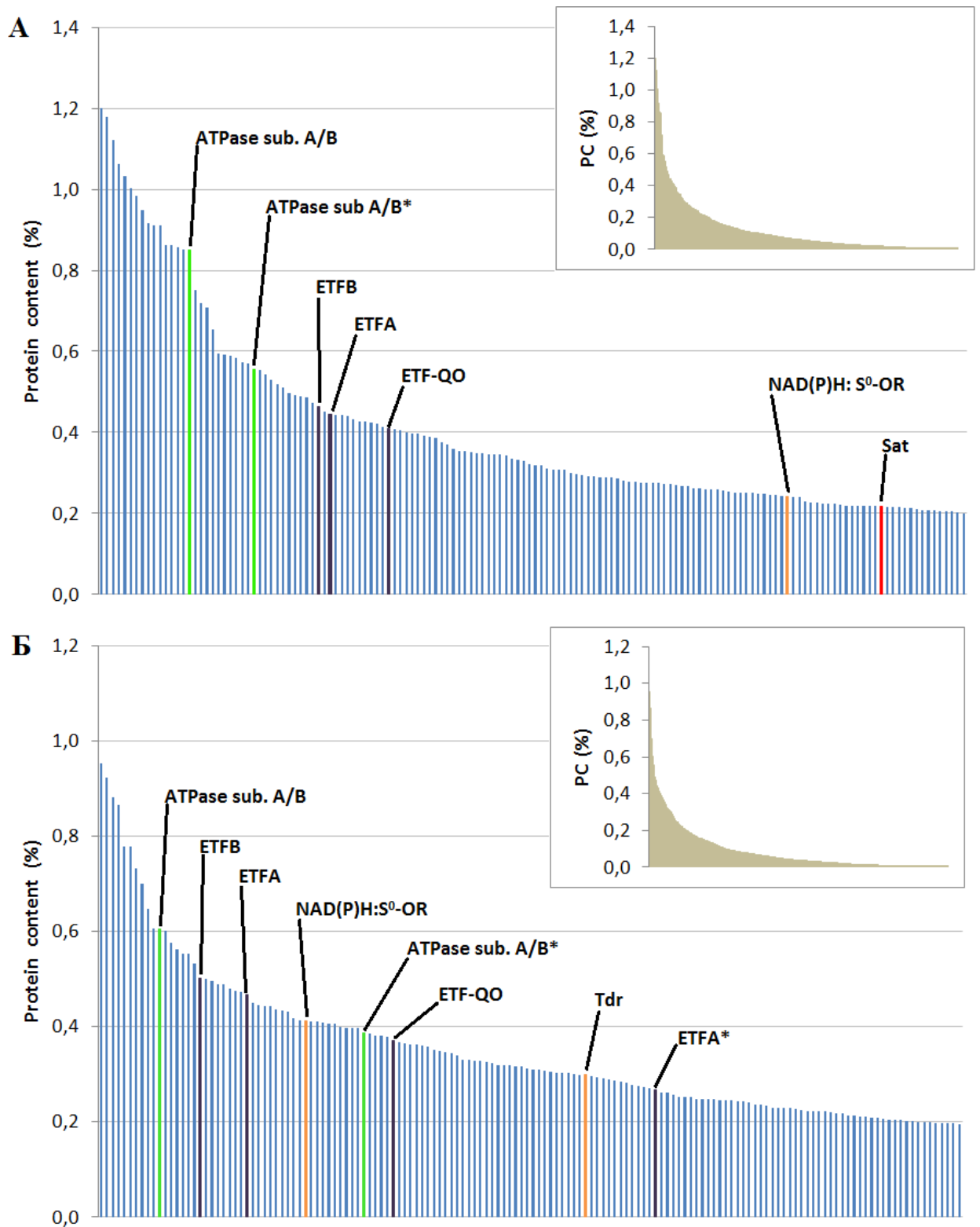


Рис. 24. Обзор результатов протеомного анализа *Thermoproteus uzoniensis* на среде с сульфатом (А) и с элементарной серой (Б). Белки расположены в соответствии с их относительным содержанием в каждом образце (вложенные графики в верхнем правом углу), а 150 наиболее многочисленных белков проанализированы более подробно.

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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На момент проведения 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 $S^{2-}/(см^3 \cdot сут)$) 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).

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).

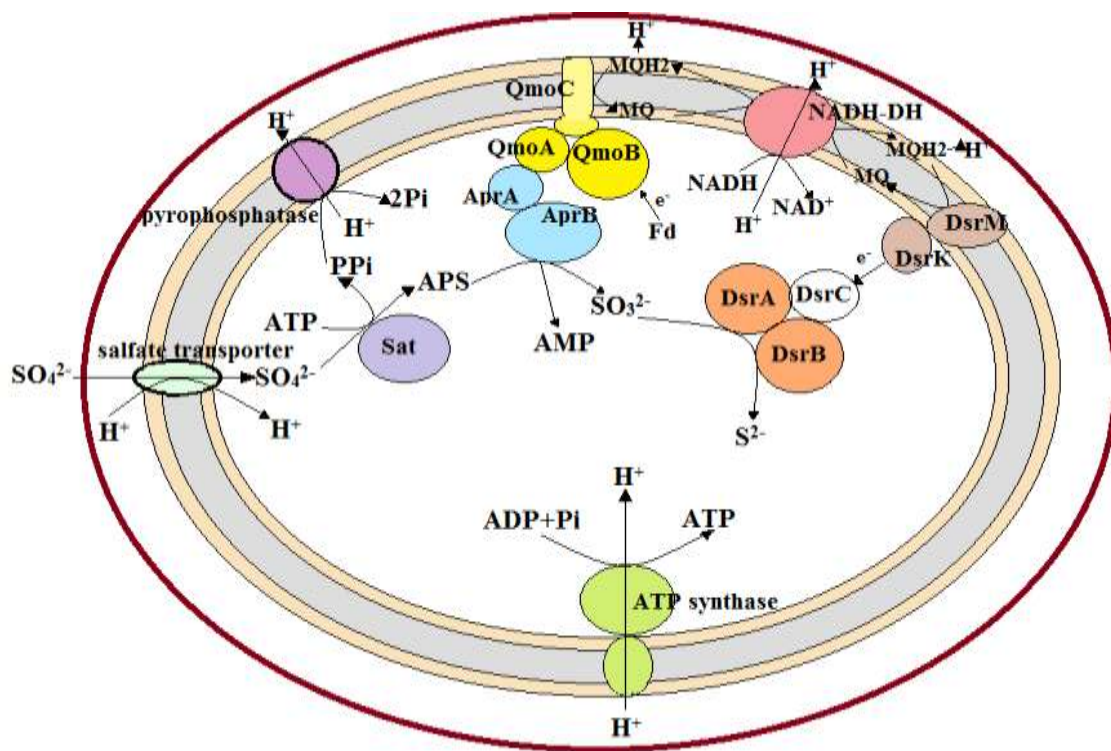


Рис. 25. Общая схема диссимиляционной сульфатредукции у '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28'.

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 ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Басков Е. А., Суриков С. Н. Гидротермы Земли // Ленинград: «Недра». - 1989. - 245 стр.
- 2) Бонч-Осмоловская Е. А., Горленко В. М., Карпов Г. А., Старынин Д. А. Анаэробная деструкция органического вещества микробных матов источника Термофильного (кальдера Узон, Камчатка) // Микробиология. - 1987. - Т. 56. - С. 1022-1028.
- 3) Заварзин Г. А. Бактерии и состав атмосферы // М.: «Наука». - 1984. - 199 стр.
- 4) Кевбрин В. В., Заварзин Г.А. Влияние соединений серы на рост галовильной гомоацететной бактерии *Acetohalobium arabaticum* // Микробиология. - 1992. - Т. 62. - № 5. - С. 812-817.
- 5) Пименов Н. В. Радиоизотопные исследования активности микроорганизмов в термальных источниках кальдеры Узон (Камчатка) // Труды Института микробиологии имени С.Н. Виноградского: Вып. 16: Термофильные микроорганизмы / Ин-т микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. Отв. Редактор В.Ф. Гальченко. – М.: МАКС Пресс. - 2011. - С. 144-159.
- 6) Электронный ресурс - <https://www.arb-silva.de/>
- 7) Электронный ресурс - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 8) Akagi J. M. Respiratory sulfate reduction // In L. L. Barton (Ed.), Sulphate reducing bacteria. New York: Plenum Press. - 1995. - P. 89–111.
- 9) Alazard D., Joseph M., Battaglia-Brunet F., Cayol J.L., Ollivier B. *Desulfosporosinus acidiphilus* sp. nov.: a moderately acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acid mining drainage sediments // Extremophiles. - 2010. - V. 14. - P. 305–312.
- 10) Badziong W., Thauer R. K. Growth yields and growth rates of *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg) growing on hydrogen plus sulfate and

- hydrogen plus thiosulfate as sole energy sources // *Archives of Microbiology*. - 1978. - V. 117. - P. 209–214.
- 11) Baeseman J. L., Smith R. L., Silverstein J. Denitrification potential in stream sediments impacted by acid mine drainage: effects of pH, various electron donors, and iron // *Microbial Ecology*. - 2006. - V. 51. - P. 232-241.
 - 12) Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A. A., Dvorkin M., Kulikov A. S., Lesin V. M., Nikolenko S. I., Pham S., Pribelski A. D., Pyshkin A. V., Sirotkin A. V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing // *Journal of Computational Biology* - 2012. - V. 19. - № 5. - P. 455-477.
 - 13) Baronofsky J. J., Schreurs W. J. A., Kashket E. R. Uncoupling by acetic acid limits growth of and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum* // *Applied and Environmental Microbiology*. - 1984. - V. 48. - P. 1134-1139.
 - 14) Benda I. Mikrobiologische Untersuchungen über das Auftreten von Schwefelwasserstoff in anaeroben Zonen des Hochmoores // *Archives of Microbiology*. - 1957. - V. 27. - P. 337-374.
 - 15) Benner S. G., Blowes D. W., Gould W. D., Herbert R. B., Ptacek C. J. Geochemistry of a permeable reactive barrier for metals and acid mine drainage // *Environmental Science and Technology*. - 1999. - V. 33. - P. 2793-2799.
 - 16) Benner S. G., Gould W. D., Blowes D. W. Microbial populations associated with the generation and treatment of acid mine drainage // *Chemical Geology*. - 2000. - V. 169. - P. 435-448.
 - 17) Blank C. E. Evolutionary timing of the origins of mesophilic sulphate reduction and oxygenic photosynthesis: A phylogenomic dating approach // *Geobiology*. - 2004. - V. 2. - P. 1-20.
 - 18) Blank C. E. Phylogenomic dating - the relative antiquity of archaeal metabolic and physiological traits // *Astrobiology*. - 2009. - V. 9. - P. 193-219.

- 19) Blank C. E. Low rates of lateral gene transfer among metabolic genes define the evolving biogeochemical niches of Archaea through deep time // *Archaea - An International Microbiological Journal*. - 2012. - V. 2012. - P. 843539.
- 20) Blodau C., Hoffmann S., Peine A., Peifer S. Iron and sulfate reduction in the sediments of acidic mine lake 116 (Brandenburg, Germany): rates and geochemical evaluation // *Water Air and Soil Pollution* - 1988. - V. 108. - P. 249-270.
- 21) Blodau C., Peine A., Hoffmann S., Pfeiffer S. Organic matter diagenesis in acidic mine lakes // *Acta Hydrochimica et Hydrobiologia*. - 2000. - V. 28. - P. 123-135.
- 22) Blodau C., Pfeiffer S. Thermodynamics and organic matter: constraints on neutralization processes in sediments of highly acidic waters // *Applied Geochemistry*. - 2003. - V. 18. P. 25-36.
- 23) Blodau C. A. Review of acidity generation and consumption in acidic coal mine lakes and their watersheds // *Science of the Total Environment*. - 2006. - V. 369. - P. 307-332.
- 24) Boucher Y., Douady C. J., Papke R. T., Walsh D. A., Boudreau M.E.R., Nesbo C. L., Case R. J., Doolittle W. F. Lateral gene transfer and the origins of prokaryotic groups // *Annual Review of Genetics*. - 2003. - V. 37. - P. 283-328.
- 25) Bragina A., Berg C., Berg G. The core microbiome bonds the Alpine bog vegetation to a transkingdom metacommunity // *Molecular Ecology*. - 2015. - V. 24. - P. 4795-4807.
- 26) Brito E. M. S., Villegas-Negrete N., Sotelo-Gonzalez I. A., Caretta C.A., Goni-Urriza M., Cassie C., Hakil F., Colin Y., Duran R., Gutierrez-Corona F., Pinon-Castillo H. A., Cuevas-Rodriguez G., Maim O., Torres J. P., Fahy A., Reyna-Lopez G. E., Guyoneaud R. Microbial diversity in Los Azufres geothermal field (Michoacan, Mexico) and isolation of representative sulfate and sulfur reduser // *Extremophiles*. - 2014. - V. 18. - P. 385-398.

- 27) Brock T. D. Notes on the ecology of thermophilic archaeobacteria // Systematic and Applied Microbiology. - 1986. - V. 7. - P. 213-215.
- 28) Brüchert V., Knoblauch C., Jorgensen B. B. Controls on stable sulfur isotope fractionation during bacterial sulfate reduction in Arctic sediments // Geochimica et Cosmochimica Acta. - 2001. - V. 65. - P. 763-776.
- 29) Brune A., Frenzel, P., Cypionka H. Life at the oxic-anoxic interface: Microbial activities and adaptations // FEMS Microbiology Reviews. - 2000. - V. 24. - P. 691-710.
- 30) Burgess E. A., Unrine J. M., Mills G. L., Romanek C. S., Wiegel J. Comparative geochemical and microbiological characterization of two thermal pools in the Uzon caldera, Kamchatka, Russia // Microbial Ecology. - 2012. - V. 63. - P. 471-489.
- 31) Canfield D. E., Des-Marais D. J. Aerobic sulfate reduction in microbial mats // Science. - 1991. - V. 251. - P. 1471-1473.
- 32) Canfield D. E., Habicht K. S., Thamdrup B. The Archean sulfur cycle and the early history of atmospheric oxygen // Science. - 2000. - V. 288. - P. 658-661.
- 33) Caporaso J. G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E. K., Fierer N., Pena A.G., Goodrich J. K., Gordon J. I., Huttley G. A., Kelley S. T., Knights D., Koenig J. E., Ley R. E., Lozupone C. A., McDonald D., Muegge B. D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J. R., Turnbaugh P. J., Walters W. A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nature Methods. - 2010. - V. 7. - №5. - P. 335-336.
- 34) Caporaso J. G., Lauber C. L., Walters W. A., Berg-Lyons D., Huntley J., Fierer N., Owens S. M., Betley J., Fraser L., Bauer M., Gormley N., Gilbert J.A., Smith G., Knight R., Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms // The ISME Journal. - 2012. - V. 6. - №8. - P. 1621-1624.

- 35) Casamayor E. O., Schäfer H., Bañeras L., Pedrós-Alió C., Muyzer G. Identification of spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2012. - V. 66. - №2. - P. 499-508.
- 36) Chernyh N. A., Mardanov A. V., Gumerov V. M., Miroshnichenko M.L., Lebedinsky A. V., Alexander Y. Merkel A. Y., Crowe D., Pimenov N.V., Rusanov I. I., Ravin N. V., Moran M. A., Bonch-Oamolovskaya E.A. Microbial life in Bourlyashchy, the hottest thermal pool of Uzon Caldera, Kamchatka // *Extremophiles*. - 2015. - V. 19. - P. 1157-1171.
- 37) Colleran E., Finnegan S., Lens P. Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams // *Antonie van Leeuwenhoek*. - 1995. - V. 67. - P. 29-46.
- 38) Crane B. R., Siegel L. M., Getzoff, E. D. Sulfite reductase structure at 1.6 Å - evolution and catalysis for reduction of inorganic anions // *Science*. - 1995. - V. 270. - P. 59-67.
- 39) Crane B. R., Getzoff E. D. The relationship between structure and function for the sulfite reductases // *Current Opinion in Structural Biology*. - 1996. - V. 6. - P. 744-756.
- 40) Cypionka H. Solute transport and cell energetic // In L. L. Barton (Ed.), *Sulphate reducing bacteria*. New York: Plenum Press. - 1995. - P. 151-184.
- 41) Dahl C., Kredich N. M., Deutzmann R., Trüper H. G. Dissimilatory sulphite reductase from *Archaeoglobus fulgidus*: Physico-chemical properties of the enzyme and cloning, sequencing and analysis of the reductase genes // *Journal of General Microbiology*. - 1993. - V.139. - P. 1817-1828.
- 42) Dahl C., Engels S., Pott-Sperling A. S., Schulte A., Sander J., Lübke Y., Deuster O., Brune D. C. Novel genes of the dsr gene cluster and evidence for close interaction of Dsr proteins during sulfur oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* // *Journal of Bacteriology*. - 2005. - V. 187. - P. 1392-1404.

- 43) David L. A., Alm E. J. Rapid evolutionary innovation during an Archaean genetic expansion // *Nature*. - 2011. - V. 469. - P. 93-96.
- 44) Deppenmeier U. The membrane-bound electron transport system of *Methanosarcina* species // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. - 2004. - V. 36. - P. 55-64.
- 45) Dhillon A., Teske A., Dillon J., Stahl D. A., Sogin M. L. Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2003. - V. 69. - P. 2765-2772.
- 46) Dhillon A., Goswami S., Riley M., Teske A., Sogin, M. Domain evolution and functional diversification of sulfite reductases // *Astrobiology*. - 2005. - V. 5. - P. 18-29.
- 47) Farquhar J., Bao H. M., Thiemens M. Atmospheric influence of Earth's earliest sulfur cycle // *Science*. - 2000. - V. 289. - P. 756-758.
- 48) Farquhar J., Cliff J., Zerkle A. L., Kamysny A., Poulton S. W., Claire M., Adams D., Harms B. Pathways for Neoproterozoic pyrite formation constrained by mass-independent sulfur isotopes // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2013. - V. 110. - P.17638-17643.
- 49) Fink A. L., Calciano L. J., Goto Y., Kurotsu T., Palleros D. R. Classification of acid denaturation of proteins – intermediates and unfolded states // *Biochemistry*. - 1994. - V. 33. - P. 12504-12511.
- 50) Finster K. Microbiological disproportionation of inorganic sulfur compounds // *Journal of Sulfur Chemistry*. - 2008. - V. 29. - P. 281-292.
- 51) Friedrich M. W. Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms // *Journal of Bacteriology*. - 2002. - V. 184. - P. 278-289.
- 52) Fishbain S., Dillon J. G., Gough H. L., Stahl D. A. Linkage of high rates of sulfate reduction in Yellowstone hot springs to unique sequence types in the dissimilatory sulfate respiration pathway // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2003. - V. 69. - P. 3663-3667.

- 53) Fischer F., Zillig W., Stetter K. O., Schreiber G. Chemolithoautotrophic metabolism of anaerobic extremely thermophilic archaeobacteria // *Nature*. - 1983. - V. 301. - P. 511-513.
- 54) Fitz R. M., Cypionka H. A study on electron transport-driven proton translocation in *Desulfovibrio desulfuricans* // *Archives of Microbiology*. - 1989. - V. 152. - P. 369-376.
- 55) Fitz R. M., Cypionka H. Generation of a proton gradient in *Desulfovibrio vulgaris* // *Archives of Microbiology*. - 1991. - V. 155. - P. 444-448.
- 56) Fortin D., Devis B., Southam G., Beveridge T. J. Biogeochemical phenomena induced by bacteria within sulfidic mine tailings // *Journal of Industrial Microbiology*. - 1995. - V. 14. - P. 178-185.
- 57) Fortin D., Davis B., Beveridge T. J. Role of *Thiobacillus* and sulfate-reducing bacteria in iron biocycling in oxic and acidic mine tailings // *FEMS Microbiology Ecology*. - 1996. - V. 21. - P. 11-24.
- 58) Fortin D., Roy M., Rioux J. P., Thibault P. J. Occurrence of sulfate-reducing bacteria under a wide range of physicochemical conditions in Au and Cu–Zn mine tailings // *FEMS Microbiology Ecology*. - 2000. - V. 33. - P. 197-208.
- 59) Fortin D., Rioux J. P., Roy M. Geochemistry of Iron and Sulfur in the Zone of Microbial Sulfate Reduction in Mine Tailings // *Water Air and Soil Pollution: Focus*. - 2002. - V 2. - P. 37-56.
- 60) Fortin D., Praharaj T. Role of microbial activity in Fe and S cycling in sub-oxic to anoxic sulfide-rich mine tailings: a mini-review // *Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences*. - 2005. - V. 6. - P. 39-42.
- 61) Friese K., Hupfer M., Schultze M., Geller W., Klapper H., Salomons W. Chemical characteristics of water and sediment in acid mining lakes of the Lusatian lignite district // In: *Acid Mining Lakes – Acid Mine Drainage, Limnology and Reclamation* (Geller W., Klapper H. and Salomons W., eds). Environmental Science Series. Berlin: Springer. - 1998. - P. 25-45.

- 62) Ghose T. K., Wikern T. Inhibition of bacterial sulphate-reduction in presence of short chain fatty acids // *Physiologia Plantarum*. - 1995. - V. 8. - P. 116-135.
- 63) Goris J., Konstantinidis K. T., Klappenbach J. A., Coenye T., Vandamme P., Tiedje J. M. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. - 2007. - V. 57. - P. 81-91.
- 64) Gregoire P., Fardeau M. L., Guasco S., Lagiere J., Cambar J., Michotey V., Bonin P., Ollivier B. *Desulfosoma profundum* sp. nov., a thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from a deep terrestrial geothermal spring in France // *Antonie Van Leeuwenhoek*. - 2012. - V. 101. - P. 595-602.
- 65) Grein F., Venceslau S. S., Schneider L., Hildebrandt P., Todorovic S., Pereira I. A. C., Dahl C. DsrJ, an essential part of the DsrMKJOP transmembrane complex in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*, is an unusual triheme cytochrome *c* // *Biochemistry*. - 2010. - V. 49. P. 8290-8299.
- 66) Grein F., Ramos A. R., Venceslau S. S., Pereira, I. A. Unifying concepts in anaerobic respiration: Insights from dissimilatory sulfur metabolism // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 2012. - V. 1827. - P. 145-160.
- 67) Gumeron V. M., Mardanov A. V., Beletsky A. V., Prokofeva M. I., Bonch-Osmolovskaya E. A., Ravin N. V., Skryabin K. G. Complete genome sequence of "*Vulcanisaeta moutnovskia*" strain 768-28, a novel member of the hyperthermophilic crenarchaeal genus *Vulcanisaeta* // *Journal of Bacteriology*. - 2011. - V. 193. - № 9. - P. 2355-2356.
- 68) Gyure R. A., Konopka A., Brooks A., Doemel W. Microbial sulfate reduction in acidic (pH 3) strip-mine lakes // *FEMS Microbiology Ecology*. - 1990. - V. 73. - P. 193-202.
- 69) Habicht K. S., Gade M., Thamdrup, B., Berg P., Canfield, D. E. Calibration of sulfate levels in the Archean Ocean // *Science*. - 2002. - V. 298. - P. 2372-2374.

- 70) Hamilton W. A. Sulfate-reducing bacteria. Physiology determines their environmental impact // *Geomicrobiology Journal*. - 1998. - V. 15. - P. 19-28.
- 71) Hamilton-Brehm S. D., Gibson R. A., Green S. J., Hopmans E. C., Schouten S., van der Meer M. T. J., Shilds J. P., Damste J. S., Elkins J. G. *Thermodesulfobacterium geofontis* sp. nov., a hyperthermophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from Obsidian Pool, Yellowstone National Park // *Extremophiles*. - 2013. - V. 17. - P. 251-263.
- 72) Hansel C. M., Fendorf S., Jardine P. M., Francis, C. A. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2008. - V. 74. - P. 1620-1633.
- 73) Hao O. J., Chen J. M., Huang L., Buglass R. L. Sulfate-reducing bacteria // *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. - 1996. - V. 26. - P. 155-187.
- 74) Haouari O., Fardeau M. L., Cayol J. L., Casiot C., Elbaz-Poulichet F., Hamdi M., Joseph M., Ollievier B. *Desulfotomaculum hydrothermale* sp. nov., a thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from a terrestrial Tunisian hot spring // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. - 2008. - V. 58. - P. 2529–2535.
- 75) Hard B. C., Friedrich S., Babel W. Bioremediation of acid mine water using facultatively methylotrophic metal-tolerant sulfate-reducing bacteria // *Microbiological Research*. - 1997. - V. 152. - P. 67-73.
- 76) Hedderich R., Hamann N., Bennati M. Heterodisulfide reductase from methanogenic archaea: A new catalytic role for an iron-sulfur cluster // *Biological Chemistry*. - 2005. - V. 386. - P. 961-970.
- 77) Herbert R. B., Benner S. G., Pratt A. R., Blowes D. W. Surface chemistry and morphology of poorly crystalline iron sulfides precipitated in media containing sulfate-reducing bacteria // *Chemical Geology*. - 1998. - V. 144. - P. 87-97.

- 78) Herlihy A. T., Mills A.L., Hornberger G. M., Bruckner A. E. The importance of sediment sulfate reduction to the sulfate budget of an impoundment receiving acid mine drainage // *Water Resources Research*. - 1987. - V. 23. - P. 287-292.
- 79) Herzsprung P., Friese K., Packroff G., Schimmele M., Wendt-Potthoff K., Winkler M. Vertical and annual distribution of ferric and ferrous iron in acidic mining lakes // *Acta Hydrochimica et Hydrobiologia*. - 1998. - V. 26. - P. 1-10.
- 80) Hipp W. M., Pott A. S., Thum-Schmitz N., Faath I., Dahl C., Trüper, H. G. Towards the phylogeny of APS reductases and sirohaem sulfite reductases in sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes // *Microbiology*. - 1997. - V. 143. - P. 2891-2902.
- 81) Hoehler T. M., Jorgensen B. B. Microbial life under extreme energy limitation // *Nature Reviews Microbiology*. - 20123. - V. 11. - P. 83-94.
- 82) Holmer M., Storkholm, P. Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments: A review // *Freshwater Biology*. - 2001. - V. 46. - P. 431-451.
- 83) Itoh T., Suzuki K., Sanchez P. C., Nakase, T. *Caldivirga maquilingensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped crenarchaeote isolated from a hot spring in the Philippines // *International Journal of Systematic Bacteriology*. - 1999. - V. 49. - P. 1157-1163.
- 84) Itoh T., Suzuki K., Nakase, T. *Vulcanisaeta distributa* gen. nov., sp. nov., and *Vulcanisaeta souniana* sp. nov., novel hyperthermophilic, rod-shaped crenarchaeotes isolated from hot springs in Japan // *International Journal of Systematic Bacteriology*. - 2002. - V. 52. - P. 1097-1104.
- 85) James A. G., Watson-Craik I. A., Senior E. The effect of organic acids on the methanogenic degradation of the landfill leachate molecules butyrate and valerate // *Water Research*. -1998. - V. 32. - P. 792-800.
- 86) Jamieson J. W., Wing B. A., Farquhar J., Hannington, M. D. Neoproterozoic seawater sulphate concentrations from sulphur isotopes in massive sulphide ore // *Nature Geoscience*. - 2013. - V. 6. - P. 61-64.

- 87) Janick P. A., Siegel L. M. Electron-paramagnetic resonance and optical spectroscopic evidence for interaction between siroheme and Fe₄S₄ prosthetic groups in *Escherichia coli* sulfite reductase hemoprotein subunit // *Biochemistry*. - 1982. - V. 21. - P. 3538-3547.
- 88) Jong T., Parry D. L. Microbial sulfate reduction under sequentially acidic conditions in an upflow anaerobic packed bed bioreactor // *Water Research*. - 2006. - V. 40. - P. 2561-2571.
- 89) Johnson D. B., Ghauri M. A., McGinness S. Biogeochemical cycling of iron and sulphur in leaching environments // *FEMS Microbiology Reviews*. - 1993. - V. 11. - P. 63-70.
- 90) Johnson D. B. Biodiversity and ecology of aciophilic microorganisms // *FEMS Microbiology Ecology*. - 1998. - V. 27. - P. 307-317.
- 91) Johnson D. B., Rowe O., Kimura S., Hallberg K. B. Development of an integrated microbiological approach for remediation of acid mine drainage and recovery of heavy metals // In: *Mine Water 2004* (Jarvis A.P., Dudgeon B.A. and Younger P., eds). University of Newcastle; Newcastle. - 2004. - P. 151-157.
- 92) Johnston D. T. Multiple sulfur isotopes and the evolution of Earth's surface sulfur cycle // *Earth-Science Reviews*. - 2011. - V. 106. - P. 161-183.
- 93) Jorgensen B. B. A comparison of methods for the quantification of bacterial sulfate reduction in coastal marine sediments: III. Estimation from chemical and bacteriological field data // *Geomicrobiology Journal*. - 1978. - V. 1. - P. 49-64.
- 94) Jorgensen B. B., Isaksen M. F., Jannasch H. W. Bacterial sulfate reduction above 100 °C in deep-sea hydrothermal vent sediments // *Science*. - 1992. - V. 258. - P. 1756-1757.
- 95) Junier P., Junier T., Podell S., Sims D. R., Detter J. C., Lykidis A., Han C. S., Wigginton N. S., Gaasterland T., Bernier-Latmani R. The genome of the Gram-positive metal- and sulfate-reducing bacterium *Desulfotomaculum*

- reducens* strain MI-1 // Environmental Microbiology. - 2010. - V. 12. - P. 2738-2754.
- 96) Friedrich M. W. Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms // Journal of Bacteriology. - 2002. - V. 184. - P. 278-289.
- 97) Kaksonen A., Puhakka J. A. Sulfate reduction based bioprocesses for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals // Engineering in Life Sciences. - 2007. - V. 7. - P. 541-564.
- 98) Kaksonen A. H., Spring S., Schumann P., Kroppenstedt R. M., Puhakka J. A. *Desulfovulgula thermocuniculi* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfate-reducer isolated from a geothermal underground mine in Japan // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 2007. - V. 57. - P. 98-102.
- 99) Karnachuk O. V., Pimenov N. V., Yusupov S. K., Frank Y. A., Kaksonen A. H., Puhakka J. A., Ivanov M. V., Lindstrom E. B., Tuovinen O. H. Sulfate reduction potential in sediments in the Norilsk Mining area, Northern Siberia // Geomicrobiology Journal. - 2005. - V. 22. - P. 11-25.
- 100) Karnachuk O. V., Gerasimchuk A. L., Banks D., Frengstad B., Stykon G. A., Tikhonova Z. L., Kaksonen A., Puhakka J., Yanenko A. S., Pimenov N. V. Bacteria of the sulfur cycle in the sediments of gold mine tailings, Kuznetsk Basin, Russia // Microbiology. - 2009. - V. 78. - №4. - P. 483-491.
- 101) Karnachuk O. V., Kurganskaya I. A., Avakyan M., Frank Y. A., Ikkert O. P., Filenko R., Danilova E. V., Pimenov N. V. An acidophilic *Desulfosporosinus* isolated from the oxidized mining wastes in the Transbaikal area // Microbiology. - 2015. - V. 84. - №5. - P.677-686.
- 102) Kaster A. K., Moll J., Parey K., Thauer R. K. Coupling of ferredoxin and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 2011. - V.108. - P. 2981-2986.

- 103) Kertesz M. A. Bacterial transporters for sulfate and organosulfur compounds // *Research in Microbiology*. 2001. - V. 152. - P. 279-290.
- 104) Kim O. S., Cho Y. J., Lee K., Yoon S. H., Kim M., Na H., Park S. C., Jeon Y. S., Lee, J. H., Yi H., Won S., Chun J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. - 2012. -V. 62. - P. 716-721.
- 105) Klein M., Friedrich M., Roger A. J., Hugenholtz P., Fishbain S., Abicht H., Blackall L. L., Stahl D. A., Wagner M. Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes // *Journal of Bacteriology*. - 2001. - V. 183. - P. 6028-6035.
- 106) Kimura S., Hallberg K. B., Johnson D. B. Sulfidogenesis in low pH(3.8–4.2) media by a mixed population of acidophilic bacteria // *Biodegradation*. - 2006. -V. 17. - P. 57-65.
- 107) Kleikemper J., Schroth M., Bernasconi S. M., Brunner B., Zeyer J. Sulfur isotope fractionation during growth of sulfate-reducing bacteria on various carbon sources // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. - 2004. - V. 68. - P. 4891-4904.
- 108) Klenk H. P., Clayton R. A., Tomb J. F., White O., Nelson K. E., Ketchum K. A., and others. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* // *Nature*. - 1997. - V. 390. - P. 364-370.
- 109) Kobayashi K., Hasegawa H., Takagi M., Ishimoto M. Proton translocation associated with sulfite reduction in a sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* // *FEBS Letters*. - 1982. - V. 142. - P. 235-237.
- 110) Koonin E. V., Martin W. On the origin of genomes and cells within inorganic compartments // *Trends in Genetics*. - 2005. - V. 21. - P. 647- 654.

- 111) Koprivova A., Kopriva S. Molecular mechanisms of regulation of sulfate assimilation: First steps on a long road // *Frontiers in Plant Science*. - 2014. - V. 5. - P. 1-11.
- 112) Koschorreck M., Wendt-Potthoff K., Geller W. Microbial sulfate reduction at low pH in sediments of an acidic lake in Argentina // *Environmental Science and Technology*. -2003. - V. 37. - P. 1159-1162.
- 113) Koschorreck M., Kleeberg A., Herzsprung P., Wendt-Potthoff K. Effects of benthic filamentous algae on the sediment-water interface in an acidic mining lake // *Hydrobiologia*. - 2007. - V. 592. - P. 387-397.
- 114) Koschorreck M. Microbial sulphate reduction at a low pH // *FEMS Microbiology Ecology*. - 2008. - V. 64. - P. 329-342.
- 115) Krumholz L. R., Wang L. Y., Beck D. A. C., Wang T. S., Hackett M., Mooney B., Juba T. R., McInerney M. J., Meyer B., Wall J. D., Stahl D. A. Membrane protein complex of APS reductase and Qmo is present in *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio alaskensis* // *Microbiology*. - 2013. - V. 159. - P. 2162-2168.
- 116) Kunisawa T. Evolutionary relationship of completely sequenced *Clostridia* species and close relatives // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. - 2015. - V. 65. - P. 4276-4283.
- 117) Küsel K., Dorsch T. Effect of supplemental electron donors on the microbial reduction of Fe(III), sulfate, and CO₂ in coal mining-impacted freshwater lake sediments // *Microbial Ecology*. - 2000. - V. 40. - P. 238-249.
- 118) Küsel K., Roth U., Trinkwalter T., Peiffer S. Effect of pH on the anaerobic microbial cycling of sulfur in mining-impacted freshwater lake sediments // *Environmental and Experimental Botany*. - 2001. - V. 46. - P. 213-223.
- 119) Laemmly U. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄ // *Nature*. - 1970. - V. 77. - P. 680-683.

- 120) Lampreia J., Pereira A. S., Moura J. J. G. Adenylylsulfate reductases from sulfate-reducing bacteria // *Methods in Enzymology*. - 1994. - V. 243. - P. 241-260.
- 121) Larsen O., Lien T., Birkeland N. K. Dissimilatory sulfite reductase from *Archaeoglobus profundus* and *Desulfotomaculum thermocisternum*: Phylogenetic and structural implications from gene sequences // *Extremophiles*. - 1999. - V. 3. - P. 63-70.
- 122) Lebedinsky A.V., Mardanov A.V., Kublanov I.V., Gumerov V.M., Beletsky A.V., Perevalova A.A., Bedzhieva S. Kh., Bonch-Osmolovskaya E.A., Skryabin K.G., Ravin N.V. Analysis of the complete genome of *Fervidococcus fontis* confirms the distinct phylogenetic position of the order *Fervidococcales* and suggests its environmental function // *Extremophiles*. - 2014. - V. 18. - P. 295-309.
- 123) Lee Y., Romanek C.S., Wiegel J. *Desulfosporosinus youngiae* sp. nov., a spore-forming, sulfate-reducing bacterium isolated from a constructed wetland treating acid mine drainage // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. - 2009. - V. 59. - P. 2743-2746.
- 124) Lens P.N.L., Kuenen J.G. The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology // *Water Science and Technology*. - 2001. - V. 44. - P. 57-66.
- 125) Leustek T., Martin M. N., Bick J. A., Davies J. P. Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. - 2000. - V. 51. - P. 141-165.
- 126) Liu M. Y., Le Gall J. Purification and characterization of two proteins with inorganic pyrophosphatase activity from *Desulfovibrio vulgaris*: Rubrerythrin and a new, highly active, enzyme // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. - 1990. - V. 171. - P. 313-318.
- 127) Loy A., Duller S., Baranyi C., Mussmann M., Ott J., Sharon I., Beja O., Le Paslier D., Dahl C., Wagner M. Reverse dissimilatory sulfite reductase as

- phylogenetic marker for a subgroup of sulfur-oxidizing prokaryotes // *Environmental Microbiology*. - 2009. - V. 11. - P. 289-299.
- 128) Lowe S.E., Jain M.K., Zeikus J.G. Biology, ecology, and biotechnological applications of anaerobic-bacteria adapted to environmental stresses in temperature, pH, salinity, or substrates // *Microbiological Reviews*. - 1993. - V. 57. - P. 451-509.
- 129) Ludwig K., Schleifer K.-H., Whitman, W. B. Revised road map to the phylum *Firmicutes* // In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3, 2nd edn., pp. 1–13. Edited by D. R. Boone, R. W. Castenholz & G. M. Garrity. New York: Springer. 2009.
- 130) Lupton F. S., Conrad R., Zeikus J. G. Physiological-function of hydrogen metabolism during growth of sulfidogenic bacteria on organic substrates // *Journal of Bacteriology*. - 1984. - V. 159. - P. 843-849.
- 131) Maillacheruvu K.Y., Parkin G.F. Kinetics of growth, substrate utilization and sulfide toxicity for propionate, acetate, and hydrogen utilizers in anaerobic systems // *Water Environment Research*. - 1996. - V. 68. - P. 1099-1106.
- 132) Mander G. J., Duin E. C., Linder D., Stetter K. O., Hedderich R. Purification and characterization of a membrane-bound enzyme complex from the sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* related to heterodisulfide reductase from methanogenic archaea // *European Journal of Biochemistry*. - 2002. - V. 269. - P. 1895-1904.
- 133) Mardanov A. V., Gumerov V. M., Beletsky A. V., Prokofeva M.I., Bonch-Osmolovskaya E. A., Ravin N. V., Skryabin K. G. Complete genome sequence of the thermoacidophilic crenarchaeon *Thermoproteus uzoniensis* 768-20 // *Journal of Bacteriology*. - 2011. - V. 193. - №12. - P. 3156-3157.
- 134) Marmur J. A procedure for the isolation DNA from microorganisms // *Journal of Molecular Biology*. - 1961. - V. 3. - P. 208-218.

- 135) Marnette E. C., Hordijk C. A., Breemen N. V., Cappenberg T. E. Sulfate reduction and S-oxidation in a moorland pool sediment // *Biogeochemistry*. - 1992. - V. 17. - P. 123-143.
- 136) Martin A. Bioenergetic parameters and transport in obligate acidophiles // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 1990. - V. 1018. - P. 267-270.
- 137) Mayilraj S., Kaksonen A. H., Cord-Ruwisch R., Schumann P., Spröer, C., Tindall B., Spring S. *Desulfonauticus autotrophicus* sp. nov., a novel thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from oil-production water and emended description of the genus *Desulfonauticus* // *Extremophiles*. - 2009. - V. 13. - P. 247-255.
- 138) McCartney D. M., Oleszkiewicz J. A. Sulfide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate // *Water Research*. - 1991. - V. 25. - P. 203-209.
- 139) Meyer B., Kuever J. Molecular analysis of the distribution and phylogeny of dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate reductase-encoding genes (*aprBA*) among sulfur-oxidizing prokaryotes // *Microbiology*. - 2007. - V. 153. - P. 3478-3498 (a).
- 140) Meyer B., Kuever J. Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes - Origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway // *Microbiology*. - 2007. - V.153. P. 2026-2044 (b).
- 141) Meier J., Babenzien H. D., Wendt-Potthoff K. Microbial cycling of iron and sulfur in sediments of acidic and pH-neutral mining lakes in Lusatia (Brandenburg, Germany) // *Biogeochemistry*. - 2004. - V. 67. - P. 135-156.
- 142) Meier J., Kleinstaub S., Bozau E., Koschorreck M., Geller W., Wendt-Potthoff K. The pilot scale neutralization experiment in acidic pit lake 111 (Lusatia, Germany) // *CLRA/ACRSD 2006. Conference Proceedings, Ottawa, Ontario*, P. 259-272.
- 143) Meier J., Piva A., Fortin D. Enrichment of sulfate-reducing bacteria and resulting mineral formation in media mimicking pore water metal ion

- concentration and pH conditions of acidic pit lakes // FEMS Microbiology Ecology. - 2012. - V. 79. - P.69-84.
- 144) Meier-Kolthoff J. P., Auch A. F., Klenk H.-P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // BMC Bioinformatics. - 2013. - V. 14. - P. 60.
- 145) Molitor M., Dahl C., Molitor I., Schäfer U., Speich N., Huber R., Deutzmann R., Truper U. G. A dissimilatory sirohaem-sulfite-reductase-type protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum* // Microbiology. - 1998. - V. 144. - P. 529-541.
- 146) Moosa S., Harrison S. T. L. Product inhibition by sulphide species on biological sulphate reduction for the treatment of acid mine drainage // Hydrometallurgy. - 2006. - V. 83. - P. 214-222.
- 147) Mori K., Kim H., Kakegawa T., Hanada S. A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: *Thermodesulfobiaceae* fam. nov., *Thermodesulfobium narugense*, gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolate from a hot spring // Extremophiles. - 2003. - V. 7. - P. 283-290.
- 148) Moura I., LeGall J., Lino A. R., Peck H. D., Fauque G., Xavier A. V., DerVartanian D.V., Moura J. I. G., Huynh B. H. Characterization of two dissimilatory sulfite reductases (desulforubidin and desulfoviridin) from the sulfate-reducing bacteria - Mossbauer and EPR studies // Journal of the American Chemical Society. - 1988. - V. 110. - P. 1075-1082.
- 149) Mulkidjanian A.Y., Bychkov A.Y., Dibrova D.V., Galperin M.Y., Koonin E.V. Origin of first cells at terrestrial, anoxic geothermal fields // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. - 2012. - V. 13. - P. 821-830.
- 150) Müller A. L., Kjeldsen K. U., Rattei T., Pester M., Loy A. Phylogenetic and environmental diversity of DsrAB-type dissimilatory (bi)sulfite reductases // The ISME Journal. - 2015. - V. 9. - №5. - P. 1152-1165.
- 151) Musmann M., Richter M., Lombardot T., Meyerdierks A., Kuever J., Kube M., Glockner F. O., Amann R. Clustered genes related to sulfate

- respiration in uncultured prokaryotes support the theory of their concomitant horizontal transfer // *Journal of Bacteriology*. -2005. -V. 187. - P. 7126-7137.
- 152) Muyzer G., Dewaal E. C., Uitterlinden A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16 s rRNA // *Applied and Environmental Microbiology*. - 1993. - V. 59. - P. 695-700.
- 153) Muyzer G., Stams A. J. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria // *Nature Reviews Microbiology*. - 2008. - V. 6. - P. 441-454.
- 154) Nordstrom D. K., Alpers C. N. Geochemistry of acid mine waters // In: *The Environmental Geochemistry of Mineral Deposits. Part A: Processes, Techniques, and Health Issues* (Plumlee G.S. and Logson M.J., eds). The Society of Economic Geologists, Littleton, CO. 1999. P. 133–160.
- 155) Nutman A. P., Bennett V. C., Friend C. R. L., Van Kranendonk M. J., Chivas A. R. Rapid emergence of life shown by discovery of 3,700-million-year-old microbial structures // *Nature*. - 2016. - V. 537. - P. 535-538.
- 156) O’Flaherty V., Mahony T., O’Kennedy R., Colleran E. Effect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulphate-reducing bacteria // *Process Biochemistry*. - 1998. - V. 33. - P. 555- 569.
- 157) Oleszkiewicz J. A., Marstaller T., McCartney D. M. Effects of pH on sulfide toxicity to anaerobic processes // *Environmental Technology Letters*. - 1989. - V. 10. P. 815-822.
- 158) Omil F., Lens P. N. L., Pol L. H., Lettinga G. Effect of upward velocity and sulphide concentration on volatile fatty acid degradation in a sulphidogenic granular sludge reactor // *Process Biochemistry*. - 1996. - V. 31. - P. 699-710.
- 159) Oliveira T. F., Vonrhein C., Matias P. M., Venceslau S. S., Pereira I. A. C., Archer M. The crystal structure of *Desulfovibrio vulgaris* dissimilatory sulfite reductase bound to DsrC provides novel insights into the mechanism of sulfate respiration // *The Journal of Biological Chemistry*. - 2008. - V. 283. - P. 34141-34149.

- 160) Oliveira T. F., Franklin E., Afonso J. P., Khan A. R., Oldham N. J., Pereira I. A. C., Archer M. Structural insights into dissimilatory sulfite reductases: Structure of desulforubidin from *Desulfomicrobium norvegicum* // *Frontiers in Microbiology*. - 2011. - V. 2. - P. 1-12.
- 161) Overbeek R., Olson R., Pusch G.D., Olsen G.J., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Gerdes S., Parrello B., Shukla M., Vonstein V., Wattam A.R., Xia F., Stevens R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST) // *Nucleic Acids Research* - 2014. - V. 42. - P. 206-214.
- 162) Parey K., Warkentin E., Kroneck P. M. H., Ermler U. Reaction cycle of the dissimilatory sulfite reductase from *Archaeoglobus fulgidus* // *Biochemistry*. - 2010. - V. 49. - P. 8912-8921.
- 163) Parey K., Demmer U., Warkentin E., Wynen A., Ermler U., Dahl C. Structural, biochemical and genetic characterization of dissimilatory ATP sulfurylase from *Allochromatium vinosum* // *PLoS One*. - 2013. -V. 8, e74707 (a).
- 164) Parey K., Fritz G., Ermler U., Kroneck P. M. H. Conserving energy with sulfate around 100 °C—Structure and mechanism of key metal enzymes in hyperthermophilic *Archaeoglobus fulgidu* // *Metallomics*. - 2013. - V. 5. - P. 302-317 (b).
- 165) Parshina S. N., Sipma J., Nakashimada Y., Henstra A. M., Smidt H., Lysenko A. M., Lens P. N., Lettinga G., Stams A.S. *Desulfotomaculum carboxydivorans* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium capable of growth at 100% CO // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. - 2005. - V. 55. - P. 2159-2165.
- 166) Philippot P., Van Zuilen M., Lepot K., Thomazo C., Farquhar J., Van Kranendonk M. J. Early Archaean microorganisms preferred elemental sulfur, not sulfate // *Science*. - 2007. - V. 317. - P. 1534-1537.

- 167) Peck H. D., LeGall J., VanBeeumen J. Biochemistry of dissimilatory sulphate reduction // Philosophical Transactions of the Royal Society, B: Biological Sciences. - 1982. - V. 298. - P. 443-466.
- 168) Peine A., Tritschler A., Küsel K., Peiffer S. Electron flow in an iron-rich acidic sediment – evidence for an acidity-driven iron cycle // Limnology Oceanography. - 2000. - V. 45. - P. 1077-1087.
- 169) Pereira I. A. C., Ramos A. R., Grein F., Marques M. C., da Silva S. M., Venceslau S. S. A comparative genomic analysis of energy metabolism in sulfate reducing bacteria and archaea // Frontiers in Microbiology. - 2011. - V. 2. - P. 1-22.
- 170) Perevalova A. A., Bedzhieva S. Kh., Kublanov I. V., Hinrichs K. U., Liu X. L., Mardanov A. V., Lebedinsky A. V., Bonch-Osmolovskaya E. A. *Fervidococcus fontis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic crenarchaeote from terrestrial hot springs, and proposal of *Fervidococcaceae* fam. nov. and *Fervidicoccales* ord. nov. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 2010. - V 60. - P. 2082-2088.
- 171) Pester M., Bittner N., Deevong P., Wagner M., Loy A. A ‘rare biosphere’ microorganism contributes to sulfate reduction in a peatland // The ISME Journal. - 2010. -V. 4. - P. 1591-1602.
- 172) Pester M., Brambilla E., Alazard D., Rattei T., Weinmaier T., Han J., and others. Complete genome sequences of *Desulfosporosinus orientis* DSM765T, *Desulfosporosinus youngiae* DSM17734T, *Desulfosporosinus meridiei* DSM13257T, and *Desulfosporosinus acidiphilus* DSM22704T // Journal of Bacteriology. - 2012. - V. 194. - P. 6300–6301.
- 173) Pfennig N. Anreicherungskulturen für rote und grün Schwefelbakterien // Zb Bact Abt Orig Supplementheft. - 1965. - V. 1. - P. 179-189.
- 174) Pierik A. J., Duyvis M. G., van Helvoort J. M., Wolbert R. B., Hagen W. R. The third subunit of desulfovirdin-type dissimilatory sulfite reductases // European Journal of Biochemistry. - 1992. -V. 205. - P. 111-115.

- 175) Pimenov N. V., Bonch-Osmolovskaya E. A. In situ activity studies in thermal environments // *Methods in Microbiology*. - 2006. - V. 35. - P. 29-53.
- 176) Pires R. H., Lourenco A. I. C., Morais F., Teixeira M., Xavier A. V., Saraiva L. M., Pereira I. A. A novel membrane-bound respiratory complex from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 2003. - V. 1605. - P. 67-82.
- 177) Pires R. H., Venceslau S. S., Morais F., Teixeira M., Xavier A. V., Pereira I. A. Characterization of the *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 DsrMKJOP complex - A membrane-bound redox complex involved in the sulfate respiratory pathway // *Biochemistry*. - 2006. - V. 45. - P. 249-262.
- 178) Praharaj T., Fortin D. Indicators of microbial sulfate reduction in acidic sulfide-rich mine tailings // *Geomicrobiology Journal*. - 2004. - V. 21. - №7. - P. 457-467.
- 179) Prokofeva M. I., Kublanov I. V., Nercessian O., Tourova T. P., Kolganova T. V., Lebedinsky A. V., Bonch-Osmolovskaya E. A., Spring S. Cultivated anaerobic acidophilic/acidotolerant thermophiles from terrestrial and deep-sea hydrothermal habitats // *Extremophiles*. - 2005. - V.9. - P. 437-448.
- 180) Rabus R., Hansen T., Widdel F. Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing Prokaryotes // In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The prokaryotes: Vol. 2*. New York: Springer-Verlag. - 2007. - P. 659-768.
- 181) Rabus R., Venceslau S. S., Wöhlbrand L., Voordouw G., Wall J. D., Pereira I. A. A post-genomic view of the ecophysiology, catabolism and biotechnology relevance of sulfate-reducing prokaryotes // *Advances in Microbial Physiology*. - 2015. - V. 66. - P. 55-321.
- 182) Ramos A. R., Keller K. L., Wall J. D., Pereira I. A. C. The membrane QmoABC complex interacts directly with the dissimilatory adenosine 5'-phosphosulfate reductase in sulfate reducing bacteria // *Frontiers in Microbiology*. - 2012. - V. 3. - P. 1-10.

- 183) Reis M. A. M., Lemos P. C., Almeida J. S., Carrondo M. J. T. Influence of produced acetic acid on growth of sulfate reducing bacteria. *Biotechnology Letters*. - 1990. - V. 12. - P. 145-148.
- 184) Richter M., Rossello-Mora R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. - 2009. - V. 106. - P. 19126-19131.
- 185) Roychoudhury A.N. Sulfate respiration in Extreme Enviroments: a kinetic study // *Geomicrobiology Journal*. - 2004. - V.21. - P. 33-43.
- 186) Sander J., Engels-Schwarzlose S., Dahl C. Importance of the DsrMKJOP complex for sulfur oxidation in *Allochromatium vinosum* and phylogenetic analysis of related complexes in other prokaryotes // *Archives of Microbiology*. - 2006. - V. 186. - P. 357-366.
- 187) Sanchez-Andrea I., Rodriguez N., Amils R., Sanz J. L. Microbial diversity in anaerobic sediments at Rio Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2011. - V. 77. - P. 6085-6093.
- 188) Sanchez-Andrea I., Knittel K., Amann R., Amils R., Sanz J. L. Quantification of Tinto River sediment microbial communities: the importance of Sulfate- Reducing Bacteria and their role in attenuating acid mine drainage // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2012. - V. 78. - P. 4638-4645.
- 189) Sanchez-Andrea I., Stams A. J., Amils R., Sanz J. L. Enrichment and isolation of acidophilic sulfate-reducing bacteria from Tinto River sediments // *Environmental Microbiology Reports*. - 2013. - V. 5. - P. 1758-2229.
- 190) Sanchez-Andrea I., Stams A. J. M, Hedrich S., Nancuqueo I., Johnson D. B. *Desulfosporosinus acididurans* sp. nov.: an acii dophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acidic sediments // *Extremophiles*. - 2015. - V.19. - P. 39-47.
- 191) Schmalenberger A., Drake H. L., Küssel K. High unique diversity of sulfate-reducing prokaryotes characterized in a depth gradient in an acidic fen // *Environmental Microbiology*. - 2007. - V. 9. - P. 1317-1328.

- 192) Sekiguchi Y., Muramatsu M., Imachi H., Narihiro T., Ohashi A., Harada H., Hanada S., Kamagata Y. *Thermodesulfovibrio aggregans* sp. nov. and *Thermodesulfovibrio thiophilus* sp. nov., anaerobic, thermophilic, sulfate-reducing bacteria isolated from thermophilic methanogenic sludge, and emended description of the genus *Thermodesulfovibrio* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 2008. - V. 58. - P. 2541-2548.
- 193) Sen A., Johnson B. Acidophilic sulphate-reducing bacteria: candidates for bioremediation of acid mine drainage // Process Metall. - 1999. - V. 9. - P. 709-718.
- 194) Sen A. M., Kimura S., Hallberg K. B., Johnson D. B. Sulfate reduction at low pH by mixed cultures of acidophilic bacteria // Proceedings of 15th International Biohydrometallurgy Symposium 2003. Athens, Greek.
- 195) Senko J. M., Zhang G., McDonough J. T., Bruns M. A., Burgos W. D. Metal reduction at low pH by a *Desulfosporosinus* species: implications for the biological treatment of acidic mine drainage // Geomicrobiology Journal. - 2009. - V. 26. P. 71-82.
- 196) Serrano A., Prerez-Castineira J. R., Baltscheffsky M., Baltscheffsky, H. H⁺-PPases: Yesterday, today and tomorrow // IUBMB Life. - 2007. - V. 59. - P. 76-83.
- 197) Shen Y., Buick R., Canfield D. E. Isotopic evidence for microbial sulphate reduction in the early Archaean era // Nature. - 2001. - V. 410. - P. 77-81.
- 198) Shen Y. N., Buick R. The antiquity of microbial sulfate reduction // Earth-Science Reviews. - 2004. - V. 64. - P. 243-272.
- 199) Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels // Analytical Chemistry. - 1996. - V. 68. - P. 850-858.
- 200) Siebers B., Zaparty M., Raddatz G., Tjaden B., Albers S. V., Bell S. D., Blombach F., Kletzin A., Kyrpides N., Lanz C., Plagens A., Rampp M., Rosinus A., von Jan M., Makarova K. S., Klenk H. P., Schuster S. C., Hensel

- R. The complete genome sequence of *Thermoproteus tenax*: A physiologically versatile member of the Crenarchaeota // PLoS One. - 2011. - V. 6. - e24222.
- 201) Slobodkina G. B., Panteleeva A. N., Kostrikin N. A., Kopitsyn D. S., Bonch-Osmolovskaya E. A., Slobodkin, A. I. *Tepidibacillus fermentans* gen. nov., sp. nov.: a moderately thermophilic anaerobic and microaerophilic bacterium from an underground gas storage // Extremophiles. - 2013. - V. 17. - P. 833-839.
- 202) Smith J., Melville M. D. Iron monosulfide formation and oxidation in drain-bottom sediments of an acid sulfate soil environment // Applied Geochemistry. - 2004. - V. 19. - P. 1837-1853.
- 203) Sperling D., Kappler U., Wynen A., Dahl C., Trüper H. G. Dissimilatory ATP sulfurylase from the hyperthermophilic sulfate reducer *Archaeoglobus fulgidus* belongs to the group of homo-oligomeric ATP sulfurylases // FEMS Microbiology Letters. - 1998. - V. 162. - P. 257-264.
- 204) Spratt H. G., Morgan M. D., Good R. E. Sulfate reduction in peat from a New Jersey pinelands cedar swamp // Applied and Environmental Microbiology. - 1987. - V. 53. - P. 1406-1411.
- 205) Stams A. J. M., Plugge C. M., De Bok F. A. M., van Houten B. H. G. W., Lens P., Dijkman H., Weijma J. Metabolic interactions in methanogenic and sulfate-reducing bioreactors // Water Science and Technology. - 2005. - V. 52. - P. 13-20.
- 206) Stetter K. O., Lauerer G., Thomm M., Neuner A. Isolation of extremely thermophilic sulfate reducers: Evidence for a novel branch of archaebacteria // Science. - 1987. - V. 236. - P. 822-824.
- 207) Stojanowic A., Mander G. J., Duin E. C., Hedderich R. Physiological role of the F420-non-reducing hydrogenase (Mvh) from *Methanothermobacter marburgensis* // Archives of Microbiology. - 2003. - V. 180. - P. 194-203.
- 208) Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Molecular Biology and Evolution. - 1993. - V. 10. - P. 512-526.

- 209) Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // *Molecular Biology and Evolution*. - 2013. - V. 30. - P. 2725-2729.
- 210) Thauer R. K., Jungermann K., Decker, K. Energy-conservation in chemotropic anaerobic bacteria // *Bacteriological Reviews*. - 1997. - V. 41. - P. 100-180.
- 211) Thauer R. K., Stackebrandt E., Hamilton W. A. Energy metabolism and phylogenetic diversity of sulphate-reducing bacteria // In L. L. Barton & W. A. Hamilton (Eds.), *Sulphate-reducing bacteria: Environmental and engineered systems*. Cambridge: Cambridge University Press. - 2007. - P. 1-37.
- 212) Thauer R. K., Kaster A. K., Seedorf H., Buckel W., Hedderich R. Methanogenic archaea: Ecologically relevant differences in energy conservation // *Nature Reviews Microbiology*. - 2008. - V. 6. - P. 579-591.
- 213) Teske A., Ramsing N.B., Habicht K., Fukui M., Kuver J., Jorgensen B.B., Cohen Y. Sulfate-reducing bacteria and their activities in cyanobacterial mats of Solar Lake (Sinai, Egypt) // *Applied and Environmental Microbiology*. - 1998. - V. 64. - №8. - P. 2943-2951.
- 214) Trüper H. G., Schlegel H. G. Sulfur metabolism in *Thiorhodaceae*. I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii* // *Antonie van Leeuwenhoek*. - 1964. - V. 30. - P. 225-238.
- 215) Tuttle J. H., Dugan P. R., Macmilla C., Randles C. I. Microbial dissimilatory sulfur cycle in acid mine water // *Journal of Bacteriology*. - 1969. - V. 97. - P. 594-602.
- 216) Ulrich G. A., Martino D., Burger K., Routh J., Grossman E. L., Ammerman J. W., Suflita J. M. Sulfur cycling in the terrestrial subsurface: commensal interactions, spatial scales, and microbial heterogeneity // *Microbial Ecology*. - 1998. - V. 36. - P. 141-151.
- 217) Utgikar V. P., Harmon S. M., Chaudhary N., Tabak H. H., Govind R., Haines J. R. Inhibition of sulfate-reducing bacteria by metal sulfide formation

- in bioremediation of acid mine drainage // *Environmental Technology*. - 2002. - V. 17. - P. 40-48.
- 218) van Houten R.T., Oude Elferink S.J.W.H. Hulshoff Pol S.E., van Hamel L.W., Lettinga G. Sulphate reduction by aggregates of sulphate-reducing bacteria and homo-acetogenic bacteria in a lab-scale gas-lift reactor // *Bioresource Technology*. - 1995. - V. 54. - P. 73-79.
- 219) Venceslau S. S., Stockdreher Y., Dahl C., Pereira I. A. C. The “bacterial heterodisulfide” DsrC is a key protein in dissimilatory sulfur metabolism // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 2014. - V. 1837. - P. 1148-1164.
- 220) Vile M. A., Bridgham S. D., Wieder R. K., Novar M. Atmospheric sulfur deposition alters pathways of gaseous carbon production in peatlands // *Global Biogeochem Cycles*. - 2003. - V. 17. - P. 1058.
- 221) Visser A., Hulshoff Pol L.W., Lettinga G. Competition of methanogenic and sulfidogenic bacteria // *Water Science and Technology*. - 1996. - V. 33. - P. 99-110.
- 222) Wagner M., Roger A. J., Flax J. L., Brusseau G. A., Stahl D. A. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration // *Journal of Bacteriology*. - 1998. - V. 180. - P. 2975-2982.
- 223) Wacey D., Kilburn M. R., Saunders M., Cliff J., Brasier M. D. Microfossils of sulphur-metabolizing cells in 3.4-billion-year-old rocks of Western Australia // *Nature Geoscience*. - 2011. - V. 4. - P. 698-702.
- 224) Wacey D., McLoughlin N., Whitehouse M. J., Kilburn, M. R. Two coexisting sulfur metabolisms in a ca. 3400 Ma sandstone // *Geology*. - 2010. - V. 38. - P. 1115-1118.
- 225) Walter C. Methanol als Elektronendonator für die mikrobielle Dekontamination sulfathaltiger Wässer // PhD thesis, University of Leipzig. 2002. <http://www.ufz.de/data/ufzbericht2-02531.pdf>
- 226) Ware D. A., Postgate J. R. Physiological and chemical properties of a reductant-activated inorganic pyrophosphatase from *Desulfovibrio desulfuricans* // *Journal of General Microbiology*. - 1971. - V. 67. - P. 145-160.

- 227) Widdel F. Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur- reducing bacteria. In: Biology of Anaerobic Microorganisms (Zehnder A.). Wiley; New York. 1988. P. 469-585.
- 228) Wieder R. K, Lang G. E. Cycling of inorganic and organic sulfur in peat from Big Run Bog, West Virginia // Biogeochemistry. - 1988. -V. 5. - P. 221-242.
- 229) Wielinga B., Lucy J. K., Moore J. N., Seastone O. F., Gannon J. E. Microbial and geochemical characterization of fluvially deposited sulfidic mine tailings // Applied and Environmental Microbiology. - 1999. - V. 65. - P. 1548-1555.
- 230) Wolin E. A., Wolin M. J., Wolfe R. S. Formation of methane by bacterioplankton extracts // The Journal of Biological Chemistry. - 1963. - V. 238. - P. 2882-2888.
- 231) Wood P. M. Chemiosmotic model for sulfate respiration // FEBS Letters. - 1978. - V. 95. - P. 12-18.
- 232) Yamaguchi T., Harada H., Hisano T., Yamazaki S., Tseng I.C. Process behaviour of UASB reactor treating a wastewater containing high strength sulfate // Water Research. 1999. - V. 33. - P. 3182-3190.
- 233) Zane G. M., Yen H. C., Wall J. D. Effect of the deletion of *qmoABC* and the promoter-distal gene encoding a hypothetical protein on sulfate reduction in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough // Applied and Environmental Microbiology. - 2010. - V. 76. - P. 5500-5509.
- 234) Zhang M. W., Lu, Z. Phylogenomic evaluation of members above the species level within the phylum *Firmicutes* based on conserved proteins // Environmental Microbiology Reports. - 2015. - V. 7. - №2. - P. 273-281.
- 235) Zeikus J. C., Dawson M. A., Thompson T. E., Ingvorsen K., Hatchikian E. C. Microbial Ecology of Volcanic Sulphidogenesis: Isolation and Characterization of *Thermodesulfobacterium commune* gen. nov. and sp. nov. // Journal of General Microbiology. - 1983. - V. 129. - P. 1159-1169.

- 236) Zillig W., Stetter K. O., Schaefer W., Janekovic D., Wunderl S., Holz P., Palm P. *Thermoproteales*: a novel type of extremely thermoacidophilic anaerobic archaeobacteria isolated from icelandic solfataras // Zentralblatt für Bacteriologie und Hygiene: I. Abt. Orig. - 1981. -V. 2. - №3. - P. 205-227.
- 237) Zverlov V., Klein M., Lucker S., Friedrich M. W., Kellermann J., Stahl D. A., Loy A., Wagner M. Lateral gene transfer of dissimilatory (bi)sulfite reductase revisited // Journal of Bacteriology. - 2005. - V. 187. - P. 2203-2208.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Диагнозы новых таксонов термоацидофильных сульфатредукторов,
выделенных в данной работе

***Thermodesulfobium acidiphilum* sp. nov.** (a.ci.di'phi.lum. N.L. n. *acidum* (from L. adj. *acidus*, sour), кислота; N.L. neut. adj. *philum* (from Gr. adj. *philos* ê–on) – дружелюбный, любящий; N.L. neut. adj. *acidiphilum* – любящий кислоту).

Клетки штамма 3127-1^T имеют палочковидную форму. Длина клетки – 1-5 мкм, диаметр – 0.5 мкм. В ранней экспоненциальной фазе роста клетки подвижны за счёт одного субполярно расположенного жгутика. В стационарной фазе клетки неподвижны. Грамотрицательная клеточная стенка. Образование спор не обнаружено.

Облигатный анаэроб. Рост осуществлялся в интервале температур от 37°C до 65°C с оптимумом при 54°C, и в интервале pH от 3.7 – 6.5 с оптимумом при 4.8-5.0. Не нуждается в присутствии NaCl в среде и способен к росту при концентрации NaCl до 1 %.

Сульфат и тиосульфат выступают в качестве акцепторов электронов, но не сульфит, элементная сера, Fe (III), фумарат, нитрат, нитрит и кислород. В присутствии сульфата в качестве донора электронов выступают H₂ и формат. Не использует дрожжевой экстракт, пептон, глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, ацетат, лактат, пируват, малат, пропионат, бутират, фумарат, сукцинат, цитрат, этанол, пропанол, метанол и CO.

Содержание G+C геномной ДНК 33.7%.

Профиль жирных кислот: C16:0, C18:0, C19:0сус, C21:0сус, C20:0, C12:0, C18:1ω9, C14:0, C22:0, C10:0, C15:0. Полярные липиды мембран представлены неидентифицированными фосфогликолипидами и шестью липидами детектированными как фосфомолибденовая кислота. МК-7 является основным хиноном клетки, в то время как МК-8 и МК-9 представляют собой минорные компоненты.

Типовой штамм 3127-1^T (=DSM 102892^T =VKM B-3043^T) был выделен из геотермально нагретой почвенной пробы с Нефтяной площадки кальдеры Узон, Камчатка, Россия.

'*Desulfothermobacter*' gen. nov. (De.sul.fo.ther.mo.bac'ter. L. pref. *de* - от; L. n. *sulfur* - сера; Gr. adj. *thermos* - горячий; M. L. n. *bacter* masc. equivalent of Gr. fern. n. *bacteria* - палочка; M. L. masc. n. *Desulfothermobacter* – термофильный организм, восстанавливающий серные соединения).

Палочковидные клетки с грамположительной клеточной стенкой.

Термофил. Ацидофил. Анаэроб.

Водород, дрожжевой экстракт, пептон и некоторые сахара выступают в качестве источника энергии. Сульфат и тиосульфат являются акцепторами электронов. Дрожжевой экстракт, мальтоза, сахароза и глюкоза могут быть использованы в процессе брожения.

Типовой вид: '*Desulfothermobacter acidiphilum*'.

Места обитания – континентальные горячие кислые источники.

'*Desulfothermobacter acidiphilum*' sp. nov. (a.ci.di'phi.lum. N.L. n. *acidum* (from L. adj. *acidus*, sour), кислота; N.L. neut. adj. *philum* (from Gr. adj. *philos* ê-on) – дружелюбный, любящий; N.L. neut. adj. *acidiphilum* – любящий кислоту).

Клетки штамма 3408-1^T имеют палочковидную форму. Длина клетки – 3-6 мкм, диаметр – 0.6 мкм. Грамположительная клеточная стенка. Образует круглые терминальные эндоспоры.

Анаэроб, но также способен к росту в микроаэробных условиях (до 2% кислорода в газовой фазе) после продолжительной лаг-фазы. Умеренный термофил с ростом в диапазоне 42-70°C (оптимум 55°C). Умеренный ацидофил с ростом в интервале pH 2.9-6.5 (оптимум 4.5). Не нуждается в присутствии NaCl в среде и способен к росту при концентрации NaCl до 2 %.

Сульфат и тиосульфат выступают в качестве акцепторов электронов, но не сульфит, элементная сера, Fe (III), фумарат, нитрат, селенат, арсенат нитрит

и кислород. Водород, дрожжевой экстракт, мальтоза, сахароза и глюкоза используются в качестве доноров электронов при росте с сульфатом или тиосульфатом. Дрожжевой экстракт, мальтоза, сахароза и глюкоза могут быть использованы в процессе брожения.

Профиль жирных кислот: ai-C15:0 (66.0%), 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%). Полярные липиды мембран были представлены неидентифицированными фосфогликолипидами и несколькими липидами детектированными как фосфолибденовая кислота. Доминирующим хиноном был МК-7.

Штамм 3408-1^T был выделен из горячего источника с подножия вулкана Мутновский, Камчатка, Россия.

Таблица П1. Результаты гидрохимического анализа состава вод в исследуемых источниках

Элемент	ПО, мг/дм ³	№3402	№3408	№3412	№3420	№3423	№3424	№3427
Li	0,00001	0,0095	0,0016	0,059	0,0017	0,00031	0,40	0,15
Be	0,000003	0,00030	0,000089	0,00020	0,000222	0,000037	<0.000003	0,000059
B	0,0002	0,012	0,041	6,80	0,11	0,0075	7,18	10,00
Na	0,002	13,53	6,12	102,34	2,30	2,30	187,96	142,78
Mg	0,0005	18,15	0,80	5,09	3,04	0,68	15,35	6,55
Al	0,0001	10,14	0,80	21,00	11,10	0,29	0,0064	1,11
Si	0,2	74,39	23,93	81,68	106,83	69,67	98,82	107,62
P	0,1	0,176	0,064	0,37	0,27	0,08	0,12	0,084
S	полуколич	521,70	40,32	310,26	983,17	376,55	46,45	263,94
Cl	полуколич	10,83	0,20	38,74	2,76	0,48	136,27	141,61
K	0,1	5,67	2,56	7,10	1,32	1,00	25,95	9,71
Ca	0,01	48,99	3,93	22,77	4,16	1,85	61,62	25,12
Sc	0,00001	<0.0022	<0.0012	<0.006	<0.0036	<0.0019	<0.0024	<0.0034
Ti	0,00005	0,016	0,18	0,027	0,0079	0,0086	0,0016	0,35
V	0,00001	0,0089	0,010	0,080	0,22	0,0035	0,00055	0,014
Cr	0,00005	0,0039	0,00096	0,049	0,023	0,021	0,00093	0,00064
Mn	0,00005	2,14	0,082	0,44	0,17	0,074	0,57	0,66
Fe	0,002	25,72	3,27	19,22	74,74	3,33	1,46	4,58
Co	0,000001	0,0138	0,0012	0,0064	0,0028	0,00075	0,0013	0,0022
Ni	0,00005	0,0015	0,00057	0,00061	0,00056	0,028	0,0017	0,00018
Cu	0,00005	0,11	0,0044	0,072	0,17	0,0021	0,00027	0,0035
Zn	0,0001	1,01	0,010	0,086	0,073	0,0088	0,0030	0,017
Ga	0,000005	0,00026	0,0010	0,0048	0,0012	0,00013	0,000045	0,00070

Таблица П1. Продолжение

Элемент	ПО, мг/дм ³	№3402	№3408	№3412	№3420	№3423	№3424	№3427
Ge	0,000001	0,000067	0,00027	0,0058	0,000050	0,000060	0,0043	0,0045
As	0,00001	0,0010	0,0083	0,32	0,0033	0,0017	0,064	0,973
Se	0,001	0,00157	0,00033	0,0044	0,0002	0,0011	0,0011	0,00035
Br	0,25	0,0021	0,0028	0,35	0,0040	0,0014	0,28	0,41
Rb	0,000005	0,013	0,0041	0,019	0,0017	0,00097	0,048	0,024
Sr	0,00003	0,15	0,025	0,13	0,013	0,010	0,25	0,083
Y	0,000001	0,0083	0,0022	0,0084	0,0011	0,000073	0,000039	0,0014
Zr	0,000005	0,0013	0,0050	0,0016	0,00037	0,00040	0,0000052	0,0029
Nb	0,000005	0,000012	0,00018	<0.000005	<0.000005	<0.000005	<0.000005	0,000051
Mo	0,00002	0,000016	0,00027	0,00027	0,000043	0,00018	0,00047	0,000590
Ru	0,000005	0,0000075	0,0000012	0,0000059	0,000011	<0.000005	<0.000005	<0.000005
Rh	0,000001	<0.000001	<0.000001	<0.000001	<0.000001	<0.000001	<0.000001	<0.000001
Pd	0,000005	<0.000005	0,000017	0,000017	<0.000005	<0.000005	<0.000005	<0.000005
Ag	0,00001	0,0000071	0,00053	0,000049	<0.000005	0,00064	<0.000005	<0.000005
Cd	0,000001	0,00045	0,000019	0,000094	0,00037	0,000013	<0.000001	0,000013
In	0,000001	<0.000001	0,0000069	0,000035	0,00012	<0.000001	<0.000001	0,000010
Sn	0,000005	0,00016	0,000053	0,00014	0,000012	0,000034	0,0000051	0,00011
Sb	0,000001	0,00018	0,00037	0,0062	0,00051	0,00035	0,00071	0,00056
Te	0,000005	<0.000005	0,000016	<0.000005	<0.000005	<0.000005	<0.000005	<0.000005
I	полуколич	0,0006	0,00024	0,013	0,002	0,00042	0,020	0,053
Cs	0,000002	0,00069	0,00020	0,0045	0,00011	0,000049	0,017	0,0048
Ba	0,00001	0,016	0,039	0,062	0,016	0,019	0,19	0,054
La	0,0000005	0,0007	0,0014	0,0025	0,00015	0,0000058	0,0000052	0,00011

Таблица П1. Продолжение

Элемент	ПО, мг/дм ³	№3402	№3408	№3412	№3420	№3423	№3424	№3427
Ce	0,0000005	0,0020	0,0039	0,0062	0,0003474	0,0000088	0,0000025	0,00036
Pr	0,0000005	0,00034	0,00057	0,00093	0,000076	0,0000029	0,0000028	0,000058
Nd	0,0000005	0,0021	0,0024	0,0041	0,00048	0,000023	0,0000068	0,000313
Sm	0,0000005	0,00054	0,00059	0,0012	0,00014	0,0000026	0,0000006	0,00012
Eu	0,0000005	0,00018	0,00016	0,00032	0,000061	0,0000040	<0,0000005	0,000048
Gd	0,0000005	0,00085	0,00055	0,0013	0,00020	0,0000062	0,0000012	0,00017
Tb	0,0000005	0,00014	0,000091	0,00023	0,000033	0,0000011	0,0000007	0,000030
Dy	0,0000005	0,00115	0,00051	0,0013	0,00021	0,0000063	0,0000032	0,00020
Ho	0,0000005	0,00028	0,00011	0,00027	0,000059	0,0000036	0,0000009	0,000049
Er	0,0000005	0,00076	0,00028	0,00088	0,00012	0,0000066	0,0000034	0,00013
Tm	0,0000005	0,00012	0,000042	0,00014	0,000020	0,0000010	<0,0000005	0,000022
Yb	0,0000005	0,00069	0,00028	0,00083	0,00014	0,0000024	0,0000015	0,00012
Lu	0,0000005	0,00011	0,000039	0,00014	0,000022	0,0000015	0,0000009	0,000023
Hf	0,0000005	0,0000290	0,00013	0,000054	0,000023	0,000016	<0,0000005	0,000074
Ta	0,00001	0,0000050	0,0000065	<0,00001	0,0000021	<0,00001	<0,00001	<0,00001
W	0,00001	0,0000093	0,0000216	<0,00001	0,000026	0,000023	0,000089	0,000066
Re	0,000001	<0,000001	<0,000001	0,0000074	<0,000001	<0,000001	<0,000001	<0,000001
Os	0,0000005	<0,0000005	<0,0000005	<0,0000005	<0,0000005	<0,0000005	<0,0000005	<0,0000005
Ir	0,000005	<0,000005	<0,000005	<0,000005	<0,000005	<0,000005	<0,000005	<0,000005
Pt	0,000005	<0,000005	<0,000005	<0,000005	<0,000005	<0,000005	<0,000005	<0,000005
Au	0,000005	<0,000005	<0,000005	<0,000005	<0,000005	<0,000005	<0,000005	<0,000005
Hg	0,00005	0,00017	0,00018	0,0083	0,0013	0,00063	0,000057	0,0050
Tl	0,000001	0,000010	0,000019	0,00024	0,000019	<0,000001	0,000084	<0,000001

Таблица П1. Продолжение

Элемент	ПО, мг/дм ³	№3402	№3408	№3412	№3420	№3423	№3424	№3427
Pb	0,00002	0,00051	0,0011	0,0022	0,00029	0,00012	0,00010	0,00046
Bi	0,000003	0,000024	0,000019	<0.000003	0,000014	0,000015	0,0000049	0,000064
Th	0,000005	0,000026	0,00016	0,00034	0,000030	0,0000046	<0.000005	0,000035
U	0,000001	0,00013	0,00013	0,00019	0,00013	0,0000060	0,0000009	0,000054

Таблица П2. Физико-химические параметры вод исследуемых источников

Проба	Место	Т	рН пол	рН лаб	CO ₂	HCO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	Об.ж.	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Мин.	Электропроводность	NH ₄	NO ₃
		°С	ед. рН	ед. рН	мг/л				мг- э/л						мкS/см	ИХ	ИХ
3402	вулкан Мутнов- ский	92	3,43	2,8	229	не обн.	378	1	4,45	53	22	15	5,2	506	1340	32	<0,1
3408		56	5,57	4	17,6	не обн.	38	1	0,25	3,7	0,8	6,4	2	53	123	1,1	<0,1
3412	кальдера Узон	62,8	2,5	2	713	не обн.	722	128	1,67	22	6,9	107	7,6	1068	4260	74	<0,1
3420		70	3	2,6	493	не обн.	470	4	0,55	4,4	4	2,4	1,3	593	2150	107	<0,1
3423		72	5	4,2	62	не обн.	215	7	0,17	1,8	1	2,4	0,86	298	875	70	<0,1
3424		52	6,1	6,4	105	464	57	140	4,76	64	19	186	22	954	1211	2,1	<0,1
3427		60	4,6	4,6	53	3	220	188	1,98	25	8,9	147	9,3	633	1270	31,6	<0,1