

**Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук»**

На правах рукописи

СЛОБОДКИНА Галина Борисовна

**НОВЫЕ ТЕРМОФИЛЬНЫЕ АНАЭРОБНЫЕ ПРОКАРИОТЫ,
ИСПОЛЬЗУЮЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ АЗОТА, СЕРЫ И ЖЕЛЕЗА В
ЭНЕРГЕТИЧЕСКОМ МЕТАБОЛИЗМЕ**

Специальность 03.02.03 – микробиология

**ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени доктора биологических наук**

МОСКВА – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.....	5
Состояние вопроса.....	7
Цель и задачи работы.....	10
Научная новизна.....	10
Теоретическая и практическая значимость работы.....	11
Положения, выносимые на защиту.....	12
Структура диссертации.....	13
Публикации.....	13

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ТЕРМОФИЛЬНЫЕ АНАЭРОБНЫЕ ПРОКАРИОТЫ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ АЗОТА, СЕРЫ И ЖЕЛЕЗА В ЭНЕРГЕТИЧЕСКОМ МЕТАБОЛИЗМЕ: ИСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

Глава 1. Термофильные анаэробные прокариоты.....	19
1.1. Определение и история изучения термофильных организмов.....	19
1.2. Местообитания термофильных прокариот.....	25
1.3. Физиологические свойства термофильных микроорганизмов.....	31
1.4. Таксономическое разнообразие.....	36
1.5 Роль и возможные пути метаболизма термофильных анаэробных прокариот в древней биосфере.....	41
1.6. Возможности использования термофилов в биотехнологии.....	45
Глава 2. Биогеохимические циклы азота, серы и железа и участие в них термофильных анаэробных микроорганизмов.....	50
2.1. Цикл азота и термофильные нитратвосстанавливающие прокариоты.....	51
2.1.1. История исследований микробной трансформации соединений азота.....	51
2.1.2. Биоразнообразие термофильных нитратредукторов.....	55
2.1.2.1. Филогенетическое разнообразие.....	55
2.1.2.2. Физиологическое разнообразие.....	59
2.1.3. Основные метаболические пути и ферменты диссимиляционного восстановления нитрата.....	60
2.2. Цикл серы и участие в нем микроорганизмов.....	63
2.2.1. Термофильные анаэробные микроорганизмы, участвующие в цикле серы.....	67
2.2.2. Основные энзиматические пути микробной трансформации соединений серы.....	74
2.3. Цикл железа и восстановление Fe(III) термофильными прокариотами.....	84
2.3.1. История исследований микробной трансформации соединений железа.....	86
2.3.2. Термофильные железовосстанавливающие прокариоты.....	87

2.3.2.1. Филогенетическое разнообразие.....	87
2.3.2.2. Физиологическое разнообразие.....	91
2.3.3. Механизмы внеклеточного переноса электронов на Fe(III).....	92
2.3.3.1. Стратегии микробного взаимодействия с нерастворимыми соединениями Fe(III).....	92
2.3.3.2. Исследование биохимических и молекулярных механизмов железоредукции.....	95

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава 3. Материалы и методы исследования.....	105
Природные образцы.....	105
Состав сред и условия культивирования.....	109
Определение морфологических, физиологических и метаболических свойств.....	111
Аналитические методы.....	113
Хемотаксономическая характеристика.....	114
Денатурирующий градиентный гель-электрофорез.....	114
Филогенетический анализ.....	116
Анализ геномов.....	117
Оценка распространения новых микроорганизмов.....	117
Глава 4. Новые термофильные прокариоты, использующие соединения азота в энергетическом метаболизме.....	118
4.1. Органотрофные нитратвосстанавливающие микроорганизмы.....	118
4.1.1. Выделение и характеристика новых таксонов органотрофных нитратредукторов.....	118
<i>Tepidibacillus fermentans</i> STGH ^T gen. nov., sp. nov.....	119
<i>Thermogutta terrifontis</i> R1 ^T gen. nov., sp. nov. и	
<i>Thermogutta hypogea</i> SBP2 ^T sp. nov.....	124
<i>Thermostilla marina</i> SVX8 ^T gen. nov., sp. nov.....	130
4.1.2. Термофильные планктомицеты.....	134
4.1.3. Распространение новых органотрофных нитратвосстанавливающих бактерий.....	140
4.2. Литоавтотрофные сероокисляющие нитратвосстанавливающие бактерии.....	145
4.2.1. Выделение и характеристика новых таксонов литоавтотрофных нитратредукторов.....	145
<i>Inmirania thermoithiophila</i> S2479 ^T gen. nov., sp. nov.....	147
<i>Thermosulfuriphilus ammonigenes</i> ST65 ^T gen. nov., sp. nov.....	153
4.2.2. Диссимиляционное восстановление нитрата в аммоний с анаэробным окислением серы.....	160
Глава 5. Новые термофильные сульфитвосстанавливающие бактерии.....	166
5.1. Выделение и характеристика новых таксонов сульфитредукторов.....	166
<i>Dissulfurirhabdus thermomarina</i> SH388 ^T gen. nov., sp. nov.....	168
<i>Thermodesulfitimonas autotrophica</i> SF97 ^T gen. nov., sp. nov.....	172
Глава 6. Новые термофильные железовосстанавливающие прокариоты.....	179
6.1. Выделение и характеристика новых таксонов железоредукторов.....	179

<i>Pyrobaculum ferrireducens</i> 1860 ^T sp. nov.....	181
<i>Carboxydocella manganica</i> SLM61 ^T sp. nov.....	181
<i>Geoglobus acetivorans</i> SBH6 ^T sp. nov.....	192
<i>Deferribacter autotrophicus</i> SL 50 ^T sp. nov.....	195
<i>Deferrisoma camini</i> S3R1 ^T gen. nov., sp. nov.....	200
6.2. Общая характеристика новых термофильных прокариот, способных восстанавливать железо, и их геномов.....	207
6.3. Распространение новых железоредукторов.....	209
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	216
ВЫВОДЫ	220
ЛИТЕРАТУРА	222

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Система биогеохимических циклов, обеспечивающая поддержание жизни на Земле, определяется ведущим циклом углерода и сопряженными с ним циклами неорганических элементов, таких как кислород, азот, сера, железо, фосфор, кальций, кремний (Заварзин, 2004). основополагающая роль в циклических превращениях основных биогенных элементов принадлежит микроорганизмам. В термальных местообитаниях биотрансформацию этих элементов осуществляют термофильные прокариоты – бактерии и археи с оптимумом роста при температурах выше 50°C. Естественными местами обитания термофилов являются зоны гидротермальной активности вулканического происхождения, такие как наземные сольфатары и горячие источники, мелководные и глубоководные морские гидротермы, а также подземные биотопы – геотермально нагреваемые подземные воды и вмещающие их горные породы. Примерами микробных местообитаний, созданных деятельностью человека и имеющих повышенную температуру, являются саморазогревающиеся органические материалы (компост, зерно, торф, уголь), системы горячего водоснабжения, сооружения биологической очистки, работающие в термофильном режиме.

Физиологические свойства термофилов крайне разнообразны: от строгих аэробов до облигатных анаэробов, от алкалофилов до экстремальных ацидофилов. Так же разнообразны и типы метаболизма – от строгих хемолитоавтотрофов до облигатных хемоорганотрофов, известны также несколько видов термофильных фототрофов (Stetter, 2006; Canganella & Wiegel, 2014). Обитающие в термальных экосистемах прокариоты образуют сложные пищевые цепи и могут выполнять функции, как первичных продуцентов, так и консументов органического вещества.

В настоящее время выделено в чистую культуру и охарактеризовано более 750 видов термофильных прокариот, около двух третей из которых являются анаэробными. Археи составляют примерно пятую часть этого количества и представлены двумя филумами *Crenarchaeota* и *Euryarchaeota*. Среди известных на сегодняшний день 30 филумов бактерий с валидно опубликованными именами (Parte, 2014, <http://www.bacterio.net>), 18 имеют анаэробных термофильных представителей. Больше всего термофилов относятся к филуму *Firmicutes*, в котором два порядка, *Thermoanaerobacterales* и *Thermolithobacterales*, представлены исключительно термофильными анаэробами. Анаэробные термофильные бактерии образуют филум *Thermodesulfobacteria*, а также филумы *Caldiserica*, *Calditrichaeota*, *Dictyoglomia* и *Ignavibacteriae*, состоящие из одного или двух членов. Исключительно термофилами, как аэробными, так и анаэробными, среди которых есть и гипертермофилы, представлен филум *Aquificae*.

Термофильные микроорганизмы принимают активное участие в современных биогеохимических процессах в наземных и морских гидротермальных местообитаниях. Они преобразуют горные породы и газогидротермальные химические соединения, синтезируя органическое вещество и изменяя состав минералов, содержащих серу, железо, кремний и другие химические элементы. Еще большую роль они могли играть в древнейших экосистемах Земли. Согласно некоторым современным гипотезам, первыми живыми организмами на планете были анаэробные автотрофные прокариоты, способные существовать при повышенных температурах (Martin & Sousa, 2016; Weiss et al., 2016). В качестве наиболее вероятных энергодающих процессов для поддержания ранних форм жизни рассматриваются восстановление соединений железа, серы и азота с использованием в качестве доноров электронов компонентов вулканических газов, таких как водород, углекислый газ и монооксид углерода (Pedersen, 1997; Lovely et al., 2004; Canfield et al., 2006).

Изучение термофильных прокариот связано с такими фундаментальными научными проблемами как происхождение жизни, эволюция биосферы, микробная экология и

биогеохимия. Так, например, биомасса микроорганизмов, населяющих глубинные экосистемы, оценивается в 9-20% от всей биомассы Земли и располагается в зоне повышенных температур (Gold, 1992; Whitman et al., 1998; McMahon & Parnell, 2014). Хотя биогеохимическая деятельность глубинных микроорганизмов в значительной степени неясна, большинство известных подземных термофилов способны к использованию соединений серы и железа (Слободкин, Слободкина 2014). Область практического применения термофилов также весьма широка и включает многие направления биотехнологии. Достаточно упомянуть использование термостабильных ферментов – ДНК-полимераз и лигаз (молекулярная биология, медицинская диагностика), а также широкого спектра гидролаз (сельское хозяйство, текстильная, пищевая, целлюлозно-бумажная, фармацевтическая промышленности), биогидрометаллургическое выщелачивание руд, очистку промышленных стоков от токсичных металлов и радионуклидов, производство биотоплива.

Состояние вопроса

Прокариоты играют важную роль в трансформации соединений азота, серы и железа в современной биосфере. Несколько ключевых этапов биогеохимических циклов, в частности фиксация атмосферного азота и восстановление сульфата, целиком определяются деятельностью микроорганизмов. С исследования преобразований соединений азота и серы в работах Виноградского и Бейеринка еще в XIX веке началась общая микробиология и изучение роли бактерий в природе. Микробное восстановление трехвалентного железа было обнаружено чуть позже, в 20-е годы XX столетия. По мере накопления данных об участии микроорганизмов в преобразовании неорганических соединений вставал вопрос о физико-химических параметрах этих процессов, в частности о верхней температурной границе жизни. Обнаружение в конце 60-х годов XX века микроорганизмов, способных расти при температурах до 80°C (Brock, 1967), послужило толчком к интенсивным исследованиям

термофильных прокариот. Вероятно, потому, что растворимость кислорода при повышенных температурах низка, большая часть термофилов являются анаэробами, и разработанные в середине XX века способы анаэробного культивирования внесли существенный вклад в развитие этой сферы микробиологии (Hungate, 1944; 1950; 1969). Пионерами в исследованиях прокариот, растущих при температурах выше 80°C, стали В. Цилиг и К.О. Штеттер (Zillig et al., 1981; Stetter et al., 1981), с работ которых начался «золотой век» гипертермофилов, продолжавшийся более двух десятилетий. Значительный вклад в исследования термофильных микроорганизмов внесли отечественные микробиологи - А.А. Имшенецкий, Л.Г. Логинова, С.И. Кузнецов, Г.А. Заварзин, Е.А. Бонч-Осмоловская. К настоящему времени выделены в чистую культуру и охарактеризованы представители более 500 видов термофильных анаэробных прокариот, и этот список продолжает пополняться. Определены природные и антропогенные местообитания термофилов, непрерывно исследуется их филогенетическое и метаболическое разнообразие.

Изучение роли микроорганизмов, в том числе термофильных, в основных биогеохимических циклах ведется уже более ста лет, однако в последние десятилетия были получены новые данные, иногда меняющие существовавшие представления. В конце 80-х - начале 90-х годов был выявлен новый процесс в цикле серы – диспропорционирование тиосульфата, сульфита и элементарной серы (Bak & Surionka, 1987). Затем этот процесс был обнаружен и у термофильных бактерий (Jackson & McInerney, 2000; Slobodkin et al., 2012). Наибольшие изменения на рубеже XX-XXI века претерпели представления о цикле азота. В 90-е годы XX века был обнаружен новый путь денитрификации - анаэробное окисление аммония (анаммокс), и микроорганизмы, осуществляющие его (Van de Graaf et al., 1990; 1995; 1996; Strous et al., 1999). В 2005 году были выделены первые аммоний-окисляющие археи и, тем самым, доказано, что первую стадию нитрификации могут осуществлять не только бактерии (Köppeke et al., 2005). Совсем недавно, в 2015 году, были выделены бактерии, окисляющие аммоний до нитрата, разрушившие более чем вековые представления

о двухстадийности процесса нитрификации (Damis et al., 2015; van Kessel et al., 2015). Все эти открытия связаны с выделением новых микроорганизмов с неизвестными ранее свойствами. В то же время множество данных получено при изучении уже известных организмов с использованием новых подходов. В частности, беспрецедентные скорости развития технологий высокопродуктивного секвенирования позволили получить значительное количество полноразмерных геномов и информации о возможных генетических детерминантах микробного метаболизма, что вызвало новый всплеск интереса к изучению микробной трансформации азота, серы и железа. Осмысление этой информации дало некоторые ответы, но вместе с тем принесло и новые вопросы. Так, обнаружена устойчивая корреляция между способностью организмов к восстановлению железа и наличием в их геномах большого количества генов, кодирующих мультигеновые цитохромы *c* (Shi et al., 2007; Smith et al., 2015), однако, механизмы переноса электронов все еще неясны. Данные геномики указывают на существование нового метаболического пути восстановления нитрата, без участия ранее известных ферментов аммонификации, однако биохимия и энзимология этого пути пока не установлены (Simon & Klotz, 2013; Hanson et al., 2013). Наиболее детально на генетическом и биохимическом уровнях изучено восстановление сульфата, но трансформация других соединений серы исследована пока фрагментарно (Grein et al., 2013; Rabus et al., 2015).

Итак, открытия последних десятилетий показывают, что, несмотря на многолетние интенсивные исследования, наши знания о микробиологии основных биогеохимических циклов нельзя считать полными, и необходимость продолжения их изучения не перестает быть актуальной. Все более глубокое погружение в эру молекулярно-биологических методов не снижает роли традиционных культивационных подходов. Очевидно, что информация, полученная в ходе анализа геномных данных, является лишь гипотетической и требует экспериментальной проверки, и пока наиболее доступным и прямым средством верификации служит работа с чистыми культурами. Таким образом, выделение новых культивируемых

микроорганизмов и изучение их физиологических свойств вместе с данными геномики и метагеномики представляют мощную комбинацию инструментов для современных исследований филогенетического и метаболического разнообразия прокариот.

Цель и задачи исследования

Целью исследования являлось изучение физиологического и филогенетического разнообразия термофильных прокариот, использующих соединения азота, серы и железа в энергетическом метаболизме.

Задачи исследования состояли в следующем:

1. Выделить из различных термальных местообитаний чистые культуры органотрофных и литоавтотрофных микроорганизмов, способных к диссимиляционному восстановлению нитрата.

2. Провести направленный поиск термофильных литоавтотрофных бактерий, способных к анаэробному окислению и/или восстановлению элементной серы или сульфита.

3. Исследовать биоразнообразие культивируемых микроорганизмов, восстанавливающих нерастворимые соединения трёхвалентного железа, в термальных местообитаниях.

4. Изучить фенотипические и генотипические свойства новых изолятов и установить их таксономическое положение.

Научная новизна

Описаны и узаконены как новые таксоны 17 видов и 12 родов термофильных анаэробных прокариот.

Выделены в чистую культуру первые термофильные представители филума *Planctomycetes*. Показана способность термофильных анаэробных планктомицетов к восстановлению нитрата, нитрита и серы.

Обнаружен и охарактеризован новый путь микробной трансформации неорганических соединений – анаэробное окисление элементной серы нитратом с образованием аммония. Выделен первый аммонификатор, растущий за счет анаэробного окисления серы – *Thermosulfuriphilus ammonigenes*. Установлена способность представителей филума *Thermodesulfobacteria* к нитратредукции.

Выделен и охарактеризован первый серодиспропорционирующий микроорганизм, обитающий в мелководных морских гидротермах - *Dissulfurirhabdus thermomarina*.

Описан первый хемолитоавтотрофный облигатный сульфитредуктор *Thermodesulfitimonas autotrophica*.

Выделен наиболее высокотемпературный анаэробный представитель класса *Gammaproteobacteria* – *Inmirania thermothiophila*, способный к росту при температуре до 68°C.

Впервые показано, что в глубоководных морских гидротермах обитают бактерии, способные к автотрофному росту с восстановлением железа (*Deferribacter autotrophicus*).

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты данной работы дают новую информацию о биологическом разнообразии термофильных прокариот – их филогении и таксономии, физиологии и метаболизме.

Обнаружение нового пути микробной диссимиляционной аммонификации нитрата с серой и выделение бактерий, осуществляющих его, расширяет представления о связи биогеохимических циклов азота и серы. Полученные литоавтотрофные микроорганизмы, в том числе диспропорционирующие соединения серы, способные расти только за счет использования вулканических газов и /или железа и серы, важны для понимания процессов, возможно, протекавших на ранних этапах существования биосферы Земли. Выделение термофильных планктомицетов и обнаружение у них способности к анаэробному росту с нитратом или серой, а также выделение бактерий, осуществляющих аммонификацию

нитрата с серой дополняет существующие сведения об экологической роли представителей филумов *Planctomycetes*, *Thermodesulfobacteria* и класса *Deltaproteobacteria*. К другому аспекту микробной экологии относятся полученные нами данные о распространении термофильных прокариот. Новые микроорганизмы были выделены из экотопов, расположенных в различных географических точках Земли. Были использованы образцы практически из всех типов природных термальных экосистем, включая наземные и глубоководные морские гидротермы, а также значительно менее исследованные мелководные морские гидротермы и подземные биотопы, из которых были получены первые термофильные представители филума *Planctomycetes*.

Практическая значимость работы заключается, прежде всего, в создании коллекции штаммов термофильных анаэробных прокариот. Новые изоляты представлены как органотрофами, так и литоавтотрофами, способными к восстановлению железа, нитрата, серы и ее соединений, а также к анаэробному окислению серных соединений. Полученные штаммы могут служить объектами для исследования путей их энергетического и конструктивного метаболизма с привлечением данных полногеномного секвенирования, транскриптомики и протеомики с целью поиска термостабильных ферментов. Непосредственное биотехнологическое применение могут найти автотрофные микроорганизмы, способные потреблять сернистый ангидрид (*Thermodesulfitimonas autotrophica*), что может быть использовано, как для очистки газовых выбросов от этого токсичного вещества, так и для уменьшения эмиссии углекислого газа.

Положения, выносимые на защиту

1. Термофильные микроорганизмы, способные использовать соединения азота, серы и железа в энергетическом метаболизме, представлены филогенетически разными группами прокариот. Биологическое разнообразие этих микроорганизмов может

продуктивно исследоваться классическими микробиологическими методами получения чистых культур и изучения их физиологических свойств.

2. В филуме *Planctomycetes* наряду с известными ранее мезофильными представителями, присутствуют и термофильные, обладающие новыми метаболическими свойствами.
3. Микробное окисление элементарной серы, сопряженное с восстановлением нитрата, может протекать не только по пути денитрификации, но и по пути аммонификации.
4. Сульфит может являться единственным акцептором электронов, используемым при анаэробном дыхании.
5. Микроорганизмы, диссимиляционно восстанавливающие Fe(III), могут использовать нерастворимые соединения трёхвалентного железа в качестве единственного конечного акцептора электронов для литоавтотрофного роста.

Структура диссертации

Диссертация состоит из введения, основной части, включающей 6 глав, заключения и выводов, изложенных на 256 страницах, включая 25 таблиц и 31 рисунок, и списка литературы из 551 наименований, из них 57 на русском и 494 на английском языке.

Публикации

Материалы диссертации содержатся в 45 печатных работах, включающих 23 экспериментальные статьи, 2 обзора и 20 тезисов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Экспериментальные статьи

1. **Slobodkina G.B.**, Kolganova T.V., Chernyh N.A., Querellou J., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. (2009) *Deferribacter autotrophicus* sp. nov., an iron(III)-reducing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 59. P. 1508-1512.
2. **Slobodkina G.B.**, Kolganova T. V., Querellou J., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. (2009) *Geoglobus acetivorans* sp. nov., an iron(III)-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 59. P. 2880-2883.
3. Kublanov I.V., Perevalova A.A., **Slobodkina G.B.**, Lebedinsky A.V., Bidzhieva S.K., Kolganova T.V., Kaliberda E.N., Rumsh L.D., Haertlé T., Bonch-Osmolovskaya E.A. (2009)

- Biodiversity of thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities in hot springs of Uzon caldera, Kamchatka (Russia) // Appl. Environ. Microbiol. V.75. P. 286-291.
4. Непомнящая Я.Н., **Слободкина Г.Б.**, Колганова Т.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Нетрусов А.И., Слободкин А.И. (2010) Филогенетический состав накопительных культур термофильных прокариот, восстанавливающих слабокристаллический оксид Fe(III) при наличии и отсутствии прямого контакта клеток с минералом // Микробиология. Т. 79, № 5. С. 672-681.
 5. Nepomnyashchaya Y.N., **Slobodkina G.B.**, Baslerov R.V, Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Netrusov A.I, Slobodkin A.I. (2012) *Moorella humiferrea* sp. nov., a novel thermophilic anaerobic, bacterium capable of growth via electron shuttling between humic acid and Fe(III). // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V.62. P. 613-617.
 6. **Slobodkina G.B.**, Panteleeva A.N., Sokolova T.G., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. (2012) *Carboxydocella manganica* sp. nov., a thermophilic, dissimilatory Mn(IV) and Fe(III)-reducing bacterium from a Kamchatka hot spring. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 62. P. 890-894.
 7. **Slobodkina G.B.**, Kolganova T.V., Kostrikina N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. (2012) *Caloribacterium cisternae* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium from an underground gas storage. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 62. P. 1543-1547.
 8. Mardanov A.V., Gumerov V.M., **Slobodkina G.B.**, Beletsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V., Skryabin K.G. (2012) Complete genome sequence of strain 1860, a crenarchaeon of the genus *Pyrobaculum* able to grow with various electron acceptors. // J. Bacteriol. V. 194. P. 727.
 9. **Slobodkina G.B.**, Reysenbach A.-L. Panteleeva A., Kostrikina N.A., Wagner I., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. (2012) *Deferrisoma camini* gen. nov., sp. nov. a novel moderately thermophilic dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent that forms a distinct phylogenetic branch in *Deltaproteobacteria*. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 62. P. 2463-2468.
 10. Slobodkin A.I., Reysenbach A.-L., **Slobodkina G.B.**, Baslerov R.V., Kostrikina N.A., Wagner I.D., Bonch-Osmolovskaya E.A. (2012) *Thermosulfurimonas dismutans* gen. nov., sp. nov. a novel extremely thermophilic sulfur-disproportionating bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 62. P. 2565-2571.
 11. Slobodkin A.I., Reysenbach A.-L., **Slobodkina G.B.**, Kolganova T.V., Kostrikina N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. (2013) *Dissulfuribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov. a novel thermophilic autotrophic sulfur-disproportionating deeply-branching delta-proteobacterium from a deep-sea hydrothermal vent of the Eastern Lau Spreading Center. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 63. P. 1967-1971.
 12. **Slobodkina G.B.**, Panteleeva A.N., Kostrikina N.A., Kopitsyn D.S., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A. I. (2013) *Tepidibacillus fermentans* gen. nov., sp. nov.: a moderately thermophilic anaerobic and microaerophilic bacterium from an underground gas storage. // Extremophiles. V. 17. P. 833–839.
 13. Mardanov A., **Slobodkina G.**, Slobodkin A., Beletsky A., Gavrillov S., Kublanov I., Bonch-Osmolovskaya E., Skryabin K., Ravin N. (2015) The genome of *Geoglobus acetivorans*: Fe(III) reduction, acetate utilization, autotrophic growth and degradation of aromatic compounds in a

- hyperthermophilic archaeon // Appl. Environ. Microbiol. V. 81. P. 1003-1012.
doi:10.1128/AEM.02705-14
14. **Slobodkina G.B.**, Lebedinsky A.V., Chernych N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. (2015) *Pyrobaculum ferrireducens* sp.nov., a novel hyperthermophilic Fe(III), selenate and arsenate-reducing crenarchaeon isolated from a hot spring // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 65. P. 851-856. doi:10.1099/ijms.0.000027
 15. **Slobodkina G.B.**, Kovaleva O.L., Miroshnichenko M.L., Slobodkin A.I., Kolganova T.V., Novikov A.A., van Heerden E., Bonch-Osmolovskaya E.A. (2015) *Thermogutta terrifontis* gen. nov., sp. nov. and *Thermogutta hypogea* sp. nov., thermophilic anaerobic representatives of the phylum *Planctomycetes* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 65. P. 760-765.
doi:10.1099/ijms.0.000009
 16. **Slobodkina G.B.**, Panteleeva A.N., Beskorovaynaya D.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. (2016) *Thermostilla marina* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic facultatively anaerobic planctomycete isolated from a shallow submarine hydrothermal vent // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 66. P. 663-668. doi:10.1099/ijsem.0.000767
 17. **Slobodkina G.B.**, Baslerov R.V., Novikov A.A., Viryasov M.B., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. (2016) *Inmirania thermothiophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, facultatively autotrophic, sulfur-oxidizing gammaproteobacterium isolated from shallow-sea hydrothermal vent // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 66. P. 701-706.
doi:10.1099/ijsem.0.000773
 18. Slobodkin A.I., **Slobodkina G.B.**, Panteleeva A.N., Chernych N.A., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. (2016) *Dissulfurimicrobium hydrothermale* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, autotrophic, sulfur-disproportionating deltaproteobacterium isolated from a hydrothermal pond of Uzon Caldera, Kamchatka // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 66. P. 1022-1026. doi 10.1099/ijsem.0.000828
 19. **Slobodkina G.B.**, Kolganova T.V., Kopitsyn D.S., Viryasov M.B., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. (2016) *Dissulfurirhabdus thermomarina* gen. nov., sp. nov. a thermophilic, autotrophic, sulfite-reducing and disproportionating deltaproteobacterium isolated from a shallow-sea hydrothermal vent // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 66. P. 2515-2519.
doi:10.1099/ijsem.0.001083
 20. **Slobodkina G.B.**, Mardanov A.V., Ravin N.V., Frolova A.A., Chernych N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. (2017) Respiratory ammonification of nitrate coupled to anaerobic oxidation of elemental sulfur in deep-sea autotrophic thermophilic bacteria // Front. Microbiol. 8:87. doi: 10.3389/fmicb.2017.00087
 21. Merkel A.Yu., Pimenov N.V., Rusanov I.I., Slobodkin A.I., **Slobodkina G.B.**, Tarnovetskii I.Yu., Frolov E.N., Dubin A.V., Perevalova A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. (2017) Microbial diversity and autotrophic activity in Kamchatka hot springs // Extremophiles. V. 21 P.307–317. DOI 10.1007/s00792-016-0903-1
 22. **Slobodkina G. B.**, Baslerov R. V., Novikov A. A., Bonch-Osmolovskaya E. A., Slobodkin A. I. (2017) *Thermodesulfitimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, obligate sulfite-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring. // Int. J. Syst. Evol. V. 67. P. 301-305. doi: 10.1099/ijsem.0.001619.

23. **Slobodkina G.B.**, Reysenbach A.-L., Kolganova T.V., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. (2017) *Thermosulfuriphilus ammonigenes* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic bacterium capable of respiratory ammonification of nitrate with elemental sulfur. // *Int. J. Syst. Evol.* V. 67. P. 3474-3479. doi: 10.1099/ijsem.0.002142.

Обзоры

24. Слободкин А.И., Гаврилов С.Н., **Слободкина Г.Б.** (2011) Термофильные железовосстанавливающие прокариоты. // Труды Института микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН: Вып. 16: Термофильные микроорганизмы / Отв. редактор В.Ф. Гальченко. М.: МАКС Пресс, 2011. – 364 с. С. 36-63.
25. Слободкин А.И., **Слободкина Г.Б.** (2014) Термофильные прокариоты из глубинных подземных местообитаний. // *Микробиология.* Т. 83, №3, С. 255-270.

Тезисы конференций

26. **Slobodkina G.B.**, Slobodkin A.I., Bonch-Osmolovskaya E.A. (2005). Phylogenetic analysis of thermophilic dissimilatory Fe(III)-reducing microbial associations. // *Abstr. Int. Workshop on Enzymology, Molecular biology and Biochemistry of Thermophiles.* 20-26 August 2005, Petropavlovsk-Kamchatsky, Russia. Book of Abstr., p 52.
27. Slobodkina G.B., Kolganova T.V., Jeanthon Ch., Querellou J., Bonch-Osmolovskaya E.A. Slobodkin A.I. *Clostridium tepidiprofundum* sp. nov., and *Deferribacter ferriautotrophicus* sp. nov., novel thermophilic bacteria from deep-sea hydrothermal vents. // *Abstr. 7th Int. Congress on Extremophiles'2008.* 7-11 September, 2008, Caprtown, South Africa. Book of Abstr. P159, p.269.
28. Slobodkin A.I., Gavrilov S.N., **Slobodkina G.B.** Thermophilic iron-reducing prokaryotes: recent developments in phylogeny and physiology. // *Abstr. 7th Int. Congress on Extremophiles'2008.* 7-11 September, 2008, Caprtown, South Africa. Book of Abstr. O27, p.54.
29. Nepomnyashchaya Y., **Slobodkina G.**, Kolganova T., Bonch-Osmolovskaya E., Netrusov A. Slobodkin A. Phylogenetic analysis of the thermophilic microbial enrichment cultures that reduce insoluble poorly crystalline Fe(III) oxide. // *Abstr. 10th Int. Conference on Thermophiles'2009.* 16-21 August, 2009, Beijing, China. Book of Abstr. P14, p.75.
30. Slobodkin A., Nepomnyashchaya Y., Gavrilov S., **Slobodkina G.** Reduction of insoluble electron acceptors by thermophilic prokaryotes // *Abstracts of the 8th International Congress on Extremophiles, «Extremophiles 2010».* September 12-16, 2010. Ponta Delgada, Portugal. P. 310.
31. **Slobodkina G.**, Kolganova T., Querellou J., Bonch-Osmolovskaya E., Slobodkin A., *Geoglobus acetivorans* sp. nov. and *Carboxydocella manganica* sp. nov., novel thermophilic metal-reducing prokaryotes // *Abstracts of the 8th International Congress on Extremophiles, «Extremophiles 2010».* September 12-16, 2010. Ponta Delgada, Portugal. P. 208.
32. **Slobodkina G.**, Bonch-Osmolovskaya E., Slobodkin A. Novel thermophilic anaerobic bacteria from underground natural gas storage // *Abstracts of the 4th Congress of European Microbiologists, FEMS 2011.* June 26-30, 2011. Geneva, Switzerland. P. 144.
33. Slobodkin A., Reysenbach A.-L., **Slobodkina G.**, Bonch-Osmolovskaya E. Elemental sulfur disproportionation by thermophilic prokaryotes: isolation of novel chemolithoautotrophic

- bacteria // Abstracts of the 4th Congress of European Microbiologists, FEMS 2011. June 26-30, 2011. Geneva, Switzerland. P. 42.
34. **Slobodkina G.**, Miroshnichenko M., Kovaleva O., Slobodkin A., van Heerden E., Lebedinsky A., Bonch-Osmolovskaya E. New thermophilic *Planctomyces* isolated from terrestrial hot springs and deep subsurface environments // Abstracts of the 9th International Congress on Extremophiles. September 10-13, 2012. Sevilla, Spain. P. 102.
 35. Slobodkin A., Reysenbach A.-L., **Slobodkina G.**, Baslerov R., Kostrikina N., Wagner I., Bonch-Osmolovskaya E. *Thermosulfurimonas dismutans* gen. nov., sp. nov. a novel extremely thermophilic sulfur-disproportionating bacterium from a deep-sea hydrothermal vent // Abstracts of the 9th International Congress on Extremophiles. September 10-13, 2012. Sevilla, Spain. P. 130.
 36. **Slobodkina G.**, Reysenbach A.-L., Panteleeva A., Kostrikina N., Wagner I., Bonch-Osmolovskaya E., Slobodkin A. *Deferrisoma camini* gen. nov., sp. nov. a novel moderately thermophilic dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent that forms a distinct phylogenetic branch in Deltaproteobacteria // Abstracts of the 9th International Congress on Extremophiles. September 10-13, 2012. Sevilla, Spain. P. 131.
 37. **G. Slobodkina**, O. Kovaleva, M. Miroshnichenko, A. Slobodkin, A. Lebedinsky, E. Bonch-Osmolovskaya Novel thermophilic anaerobic representatives of the phylum *Planctomyces*. // Abstracts of the EMBO Workshop *Planctomyces-Verrucomicrobia-Chlamydiae* Superphylum: Exceptions to the bacterial definition? Heidelberg, Germany, 28 February - 2 March, 2013. P.40.
 38. **Slobodkina G.**, van Heerden E., Bonch-Osmolovskaya E., Slobodkin A. Novel thermophilic anaerobic bacteria from deep South African gold mine. Abstracts of the 12th International Meeting on Thermophiles. September 8-13, 2013. Regensburg, Germany. P. 81.
 39. Gavrilov S., Chernyh N., **Slobodkina G.**, Merkel A., Smirnov I., Bretschger O., Slobodkin A. Electrocatalytic activity of natural thermophilic microbial communities inhabiting terrestrial hot springs of Kuril- Kamchatkan Volcanic Arc. // Abstracts of the 12th International Meeting on Thermophiles. September 8-13, 2013. Regensburg, Germany. P. 61.
 40. **Slobodkina G.B.**, Bonch-Osmolovskaya E. A., Slobodkin A.I. Novel thermophilic bacteria capable of chemolithotrophic anaerobic sulfur oxidation. // Abstracts of the EMBO Workshop Microbial sulfur metabolism. 12 – 15 April 2015. Helsingør, Denmark. P.96.
 41. **Slobodkina G.B.**, Bonch-Osmolovskaya E. A., Slobodkin A.I. New thermophilic chemolithotrophic bacteria capable of anaerobic oxidation of sulfur compounds. // Abstracts of the 13th International Conference on Thermophiles. August-September 30-09, 2015. Santiago, Chile. P. 121.
 42. **Slobodkina G.B.**, Bonch-Osmolovskaya E. A., Slobodkin A.I. New thermophilic *Proteobacteria* capable of chemolithoautotrophic utilization of sulfur compounds. // Abstracts of 11th International Congress on Extremophiles, September 12-16, 2016. Kyoto, Japan. P5, P. 139.
 43. Фролова А.А., **Слободкина Г.Б.**, Слободкин А.И. '*Thermosulfurimonas litoralis*' sp. nov. - новая анаэробная термофильная серо-диспропорционирующая бактерия из мелководных морских гидротерм. // Научные труды V съезд Физиологов СНГ, V съезд Биохимиков

- России, Конференция ADFLIM. Сочи – Дагомыс, Россия. 4-8 октября 2016 г. Acta Naturae. ISBN 978-5-9902238-4-4. Спецвыпуск Том 2. 2016. Стр. 208.
44. **Слободкина Г.Б.**, Бонч-Осмоловская Е.А., Слободкин А.И. Первые термофильные представители филума *Planctomycetes*. // Научные труды V съезд Физиологов СНГ, V съезд Биохимиков России, Конференция ADFLIM. Сочи – Дагомыс, Россия. 4-8 октября 2016 г. Acta Naturae. ISBN 978-5-9902238-4-4. Спецвыпуск Том 2. 2016. Стр. 205.
45. **Slobodkina G.B.**, Bonch-Osmolovskaya E. A., Slobodkin A.I. New thermophilic chemolithofutotrophic sulfite-reducing bacteria. // Abstracts of the 7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017 Congress). July 9-13, 2017. Valencia, Spain. P.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ТЕРМОФИЛЬНЫЕ АНАЭРОБНЫЕ ПРОКАРИОТЫ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ АЗОТА, СЕРЫ И ЖЕЛЕЗА В ЭНЕРГЕТИЧЕСКОМ МЕТАБОЛИЗМЕ: ИСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

ГЛАВА 1. ТЕРМОФИЛЬНЫЕ АНАЭРОБНЫЕ ПРОКАРИОТЫ

1.1. Определение и история изучения термофильных организмов

С антропоцентрической точки зрения условия окружающей среды, неблагоприятные для жизни человека, рассматриваются как экстремальные. К ним относятся высокие (выше 50°C) и низкие (близкие к 0°C) температуры, повышенная или пониженная кислотность и соленость, чрезмерное (превышающее атмосферное) давление. Соответственно, организмы, способные не просто выживать, но и успешно развиваться в таких условиях, называют экстремофилами. Одними из представителей экстремофилов являются термофилы. В настоящее время общепринятым считается определение, согласно которому термофильными прокариотами называют микроорганизмы с температурным оптимумом роста выше 50°C (Wagner & Wiegel, 2008), которого мы придерживались в данной работе. Изучение термофильных прокариот связано с такими фундаментальными научными проблемами как происхождение жизни, эволюция биосферы, микробная экология и биогеохимия. Термофильные прокариоты представляют интерес и с прикладной точки зрения.

Наличие живых организмов в горячих источниках отмечалось еще в античные времена (цитируется по Brock, 1967). В середине XIX века также появлялись сообщения о росте красных и зеленых водорослей в горячих источниках в окрестностях Карлсбада (Германия) и на острове Иския (Италия) (цитируется по Brock, 1967; Morrison & Tanner, 1922). В работе, опубликованной в 1922, содержатся сведения уже о 68 публикациях, посвященных термофильным бактериям, наблюдаемым и/или выделенным из образцов почв,

воды, пищи, навоза, силоса, сена, хлопка, табака (Morrison & Tanner, 1922), хотя некоторые из них в настоящее время не рассматривались бы как термофилы. В этой же работе высказывается предположение, что впервые термин «термофильный» был использован в 1879 году французским исследователем Микелем (Miquel), выделившим и описавшим бактерию '*Bacillus thermophilus*', имевшую температурный оптимум роста при 65-70°C и верхний предел роста при 75 °С. Приводятся также различные определения этого термина, использовавшиеся разными микробиологами в то время. Тем не менее, несмотря на накопленный фактический материал, общепринятым пределом жизни считали температуру 42-45°C (Morrison & Tanner, 1922). Кроме того, известные факты тепловой денатурации белков подкрепляли уверенность в невозможности существования живых организмов при высоких температурах. Первые систематические исследования термофилов в начале XX веков были связаны, главным образом, с решением практических задач: переработкой отходов растениеводства и предотвращением порчи пищевых продуктов, подвергавшихся тепловой обработке. При изучении процесса разложения целлюлозы было установлено, что более эффективно этот процесс проходит при добавлении вытяжки конского навоза и повышении температуры до 55-65°C. Были выделены первые термофильные целлюлолитические бактерии, в частности *Clostridium thermocellum* (Viljoen et al., 1927). Приблизительно в то же время были выделены бактерии, вызывающие свертывание молока при 50 и 71°C, описанные как *Bacillus coagulans* и *B. calidolactis* (Hammer, 1915; Sarles & Hammer, 1932; Hussong & Hammer, 1928). Некоторые микроорганизмы, приводящие к порче консервированных пищевых продуктов, были также отнесены к роду *Bacillus* (Donk, 1920; Weinzirl, 1919).

Исследования 30-60-х годов, как и в предыдущие годы, были сконцентрированы, главным образом, на прикладных аспектах. Возможности получения при помощи термофильных бактерий этилового спирта, органических кислот и горючих газов из растительного сырья изучались во многих странах, включая Советский Союз, где эти

вопросы активно разрабатывались В.В. Первозванским, А.А. Имшенецким, Л.Г. Логиновой, М.Н. Ротмистровым. Выделение новых организмов и использование активных смешанных культур позволяло добиваться высоких выходов целевых продуктов (Первозванский и Чельцова, 1935, 1936; Имшенецкий, 1939; Логинова, 1937; Ротмистров, 1939, 1940). С развитием прикладной химии, применение микробного гидролиза целлюлозы для получения спиртов и органических кислот перестало быть экономически выгодным, и исследования сфокусировались на возможностях применения термофильных целлюлолитиков и их ферментов для улучшения питательности кормов (Логинова и др., 1966). Термофильные метаногены начали активно исследоваться, когда было показано, что они являются продуцентами витамина В₁₂, причем при повышении температуры его выход увеличивался в разы (Neujahr & Calcieri, 1958, 1960; Букин 1962; Быховский и Панцхава, 1961). Изучение термофилов было также вызвано необходимостью разработки методов для подавления их развития, вызывающего порчу консервов, коррозию железа и стали, саморазогревание зерна, сена, торфа и угля (Рогачева, 1950; Jacob, 1960; Postgate, 1959; Исаченко и др., 1936).

В это же время активизируется интерес к микроорганизмам из термальных местообитаний, связанный с их биогеохимическими функциями. В частности, Джон Р. Постгейт, С.И. Кузнецов и М.В. Иванов исследовали роль микроорганизмов в процессах восстановления сульфатов в природе и их участие в генезисе нефти, в образовании отложений элементной серы и вторичных осадочных пород (Postgate, 1959; Иванов, 1957; Кузнецов и др., 1962; Кузнецов, 1963).

К середине 60-х годов XX века количество имеющихся в лабораторных культурах термофильных микроорганизмов исчислялось многими десятками. Они были выделены из горячих источников, почв, включая почвы Крайнего Севера, сточных вод, компостов, торфа, сена (Логинова и др., 1966). В соответствии с принятыми в то время правилами систематики и таксономии, аэробные спорообразующие палочки относили к бациллам. Термофильные штаммы были отнесены к нескольким видам, имевшим также и мезофильных

представителей: *Bacillus coagulans*, *Bac. circulans*, *Bac subtilis*, *Bac. spaericus* (Allen, 1953). Другие авторы считали самостоятельными термофильными видами только *Bac. stearothermophilus* и *Bac. coagulans* (Gordon & Smith, 1949; Smith et al., 1952). Кроме того, к видам *Bac. thermodenitrificans*, *Bac. megaterium*, *Bac. brevis* и *Bac. lentis* были отнесены термофильные аэробные бактерии, выделенные из термальных зон горы Янган-Тау (Южный Урал) и острова Кунашир (Головачева и др., 1965). Были выделены также тионовые бактерии родов *Thiobacillus* и *Thiospirillum* (Emoto & Yoneda, 1942; Егорова и Дерюгина, 1963; Заварзин и Жилина, 1964). Кроме бацилл, аэробные термофильные микроорганизмы были представлены большим количеством штаммов актиномицетов, растущих при температурах 50-60°C и даже 60-67°C (Логинова и др., 1966; Cross, 1968). Значительно меньше было известно о термофильных анаэробных прокариотах. Сведения ограничены несколькими видами целлюлолитических (целлюлозных) бактерий, отнесенных к роду *Clostridium*, в который объединяли анаэробные спорообразующие бактерии (Viljoen et al., 1927; McClung, 1935; Fontaine et al., 1942; Enebo, 1951; Логинова и др., 1966). Для спороносных сульфатвосстанавливающих (десульфурierenden) бактерий был предложен новый род *Desulfotomaculum* с единственным термофильным видом *D. nigrificans* (Campbell & Postgate, 1965). Небольшое число выделенных анаэробов, а также то, что большинство из описанных видов целлюлозных бактерий, по-видимому, не представляли собой чистых культур и имели аэробных спутников, было вызвано большими трудностями при работе с ними (Логинова и др., 1966). Пионером в культивировании строго-анаэробных микроорганизмов стал Роберт Эдвард Хангейт (Chung et al., 1997). Разработанные им методы приготовления сред для культивирования анаэробов и получения колоний в толще и в тонком слое агара (Hungate, 1944; 1950; 1969) и в наши дни используется микробиологами во всем мире.

К концу 60-х годов наиболее высокотемпературными известными микроорганизмами были аэробные *Bacillus* sp. ($T_{\text{опт}}$ 65-70°C), а также анаэроб *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* (ранее *Clostridium thermohydrosulfuricum*) с $T_{\text{опт}}$ 67-69°C (Логинова и

др., 1966; Klaushofer & Parkkinen, 1965; Lee et al., 1993). Верхним пределом роста считалась температура 73°C (Kempner, 1963). Толчком к интенсивному исследованию существования жизни при более высоких температурах послужили работы Томаса Дэйла Брока (род. 1926), начавшего в 1965 году исследования микробных сообществ в термальных источниках Йеллоустонского Национального Парка (Brock, 1967; Brock, 1997). Выделенные им *Thermus aquaticus* и *Sulfolobus acidocaldarius* имели наиболее высокие на тот момент температуры роста - до 80°C (Brock & Freeze, 1969; Brock et al., 1972). Поиски подобных организмов привели к обнаружению первых гипертермофилов, *Thermoproteus tenax* и *Methanothermus fervidus* (Zillig et al., 1981; Stetter et al., 1981). В отличие от *Thermus aquaticus* и *Sulfolobus acidocaldarius*, эти организмы могли развиваться при температурах до 97°C и были строгими анаэробами. С этого момента начался «золотой век» гипертермофилов, продолжавшийся более двух десятилетий, очень во многом благодаря усилиям Карла Отто Штеттера. Он же дал определение гипертермофильных прокариот как микроорганизмов, имеющих наибольшую скорость роста при температурах от 80 до 100-106°C (Stetter, 1988a; Stetter, 1996). Начало интенсивных исследований (гипер)термофильных микроорганизмов исторически совпало с открытием в 1977 году глубоководных гидротерм (называемых «черными курильщиками») (Corliss et al., 1979). Здесь обнаружили полноценный биогеоценоз, полностью автономный и независимый от солнечной энергии и организмов, обитающих на поверхности (Karl et al., 1980; Jannasch & Wirsen, 1979; Гебрук, 2002). Это открытие перевернуло представление о жизни на Земле, и стало мощным стимулом для изучения новой, основанной на хемосинтезе, экосистемы. Как следствие такого совпадения, микробиологические исследования в этот период были сконцентрированы, главным образом, на хемолитоавтотрофных гипертермофильных прокариотах - продуцентах органического вещества в глубоководных гидротермах (Jannasch & Mottl, 1985; Karl, 1995; Adams, 1998; Мирошниченко, 2004; Miroshnichenko & Bonch-Osmolovskaya, 2006). В период с 1980 по 2000 годы 30-40% всех выделенных и описанных анаэробных термофилов составляли

гипертермофилы, многие из которых были выделены из морских глубоководных гидротерм. На сегодняшний день известно чуть более ста видов анаэробных гипертермофилов, и половина из них выделена и изучена в лаборатории Штеттера (Stetter, 2013). Для биохимических и биофизических исследований, требующих больших количеств биомассы, им в сотрудничестве с инженерной компанией был создан новый тип ферментеров для культивирования микроорганизмов при высоких температурах и химически агрессивных средах, которые стали основой для Архейного Центра Регенсбургского университета, ФРГ (das Regensburger Biotechnikum (Archaeenzentrum)). Была разработана уникальная техника для получения чистых культур анаэробных гипертермофилов из одной отдельной клетки при помощи так называемого «оптического пинцета» (Huber et al., 1995). К достижениям последних лет можно отнести обнаружение *Nanoarchaeum equitans*, представляющего новое царство в домене *Archaea* (Huber et al., 2002a). Это самый маленький живой организм с диаметром клетки 400 нм, растущий только на поверхности клетки-хозяина, кренархеоты *Ignicoccus hospitalis*. Удалось получить нуклеотидные последовательности геномов обоих организмов (Waters et al., 2003; Podar et al., 2008). Отсутствие в геноме *Nanoarchaeum equitans* генов, кодирующих биосинтез аминокислот, нуклеотидов, липидов, кофакторов указывает на симбиотическое, возможно, паразитическое отношение к клетке-хозяину. Однако, в настоящее время еще нет полного понимания отношений в системе *Nanoarchaeum– Ignicoccus* (Stetter, 2006; Stetter, 2013). Другой гипертермофил, ‘*Candidatus Korarchaeum cryptofilum*’, выделенный из горячего источника Йеллоустонского Национального Парка, стал первым культивируемым представителем одной из наиболее глубоких архейных ветвей, филума *Korarchaeota* (Elkins et al., 2008).

В настоящее время выделено в чистую культуру и охарактеризовано более 750 видов термофильных прокариот, и этот список продолжает пополняться благодаря усилиям ученых многих стран, в первую очередь, Германии, России, США, Франции и Японии. Значительный вклад в изучение микробных сообществ в термальных местообитаниях,

обеспечивший лидерство и признание в научном сообществе, внесли отечественные микробиологи - Г.А. Заварзин, Е.А. Бонч-Осмоловская, сотрудники лаборатории гипертермофильных микробных сообществ. За последние несколько десятилетий ими были выделены и описаны десятки новых таксонов термофильных и гипертермофильных прокариот; были охарактеризованы новые метаболические группы термофилов, в том числе анаэробные гидрогеногенные карбоксидотрофы, термофильные железоредукторы, термофильные литоавтотрофные бактерии, осуществляющие диспропорционирование соединений серы (Светличный и др., 1990; Заварзин, 2004; Мирошниченко, 2004; Слободкин, 2005; Sokolova et al., 2009; Bonch-Osmolovskaya, 2011).

1.2. Местообитания термофильных прокариот

Естественными местообитаниями термофильных прокариот являются наземные, подземные и морские биотопы с повышенными температурами. Температура земной коры неоднородна, и в верхней части земной коры выделяют три температурные зоны: I – зона сезонных колебаний, II – зона постоянной температуры, III – зона нарастания температуры. Изменение температуры горных пород и подземных вод в первой зоне определяется климатическими условиями местности и интенсивностью солнечного излучения, глубина варьирует в пределах 1.5-40 м. По мере углубления влияние суточных и сезонных температур уменьшается и начинается зона постоянной температуры, в которой температура породы и вод равна среднегодовой температуре воздуха за многолетний период для данной местности. Глубина этого пояса для различных географических пунктов составляет 1-40 м (Ананьев, 2005; Паффенгольц, 1978). Ниже горизонта постоянных температур под влиянием внутренней теплоты земли температура повышается. Величина нарастания температуры на каждые 100 метров глубины называется геотермическим градиентом. Обычно геотермический градиент колеблется от 0.5–1 до 20°C и в среднем составляет около 3°C на 100 метров. Глубина (в метрах) ниже пояса постоянных температур, которой нужно достичь,

чтобы температура повысилась на 1°C, называется геотермической ступенью. Средняя величина геотермической ступени равна 33 м, однако, температура пород и содержащихся в них вод зависит не только от глубины залегания, но и от геологического строения различных регионов Земли (Агеев, 2014; Дворов, 1972). Так, в зонах современного вулканизма, рифтовых долинах континентов, срединно-океанических хребтах, в местах платформенных погружений и предгорных краевых прогибов создаются особые гидрогеологические условия, способствующие выходу гидротермальных растворов на поверхность.

Наземные биотопы. Термофильные прокариоты образуют сложные сообщества в зонах геотермальной активности, в первую очередь, вулканического происхождения, таких как наземные сольфатары и горячие источники, кипящие грифоны и гейзеры, грязевые котлы, парогазовые струи, газовые фумаролы. Это открытые по флюидному компоненту системы, характеризующиеся высокой скоростью протекающих в них процессов преобразования вещества, для которых обязательной является связь с магматизмом. Перегретая вода в виде паровых струй выделяется из магматического расплава вместе с газами и легколетучими компонентами, образуя гидротермальный флюид, который устремляется в верхние, более холодные горизонты. Остывая, пар может конденсироваться в жидкую воду; в ней растворяется большинство летучих компонентов – так появляется гидротермальный раствор «ювенильного» (первозданного) типа (Агеев, 2004; Дворов, 1972). В то же время атмосферные осадки и другие поверхностные воды по трещинным и поровым зонам проникают в более глубокие горизонты. В ходе движения происходит насыщение воды содержащимися в породах солями и газами и таким образом формируются инфильтрационные термальные воды. Вулканические гидротермальные растворы представляют собой смесь «ювенильных» и инфильтрационных вод, и их химический состав связан через флюид с химическим составом магматического очага и через метеорные воды с атмосферой. Изменение физико-химических параметров растворов по мере их фильтрации к поверхности создает геохимические барьеры (Перельман, 1975), служащие местом развития

микробных сообществ. Термофильные микроорганизмы используют магматические газы, основными компонентами которых являются H_2 , H_2O , CH_4 , CO , CO_2 , а также соединения серы. (Заварзин, 1984). Первичными продуцентами органического вещества в наземных гидротермах служат как фотосинтетики, так и хемоавтотрофные микроорганизмы. Для наземных природных биотопов термофилов характерны широкий диапазон pH (pH 0 - 9.0) и низкое содержание солей (0.1 - 0.5%). Многие из них богаты минералами железа, гидроксидами, пиритом, магнетитом, в меньшей степени распространены соединения мышьяка, реальгар и аурипигмент, присутствуют также соединения азота, аммоний и нитрат (Stetter, 2006). Примерами наиболее известных континентальных районов с высокой вулканической активностью, откуда были выделены термофилы, служат Йеллоустонский Национальный парк (США), сольфатара Пискарелли (Италия), Япония, Новая Зеландия, Исландия, Гавайский архипелаг, острова Фиджи, а также Камчатка и Курильские острова (Россия).

Морские биотопы. К морским экотопам, связанным с вулканизмом, относятся геотермально нагреваемые морские осадки и вода, мелководные и глубоководные гидротермы. Как и в случае континентальных вулканических выходов, гидротермальный раствор здесь представляет собой смесь флюида, поднимающегося от магматического очага, с морской водой, проникающей вглубь через трещины океанической коры. В глубоководных гидротермах перегретый, но остающийся жидким из-за огромного гидростатического давления флюид, поднимаясь вверх, несет в себе большие массы элементов, выщелоченных из базальтовых пород океанической коры. Граница вода-дно, где гидротермальный флюид смешивается с холодной океанической водой, является важным геохимическим барьером, и большая часть рудного вещества гидротерм отлагается именно на этой границе, образуя металсульфидные постройки («черные курильщики») или рассеивается гидротермальными факелами на значительном расстоянии. Глубоководные гидротермальные системы отличаются от наземных рядом характерных особенностей. Прежде всего, они отделены от

поверхности океаном, препятствующим проникновению солнечного света, и, таким образом, трофические цепи в глубоководных системах базируются, прежде всего, на хемосинтезе. Однако глубоководные системы в современном океане нельзя рассматривать как полностью независимые от солнечной энергии, поскольку кислород, растворенный в воде и являющийся окислителем для аэробных организмов, образуется поверхностными фотосинтезирующими организмами. Подводные гидротермальные системы, как и окружающая морская вода, содержат высокие концентрации солей и имеют рН от 5 до 8.5 (Stetter, 2006). Микроорганизмы этого экотопа существуют в экстремальных условиях, подвергаясь воздействию высоких температур и давления, повышенных концентраций тяжелых металлов, резких градиентов всех физико-химических параметров и концентраций веществ, необходимых для метаболизма (Слободкин и др., 1999; Мирошниченко, 2004). Глубоководные гидротермы, открытые в районе Галапагосских островов, затем были обнаружены во всех океанах, кроме Северного Ледовитого. Наиболее изучены гидротермальные поля Восточно-Тихоокеанского Поднятия, Срединно-Атлантического Хребта и Центрально-Индийского Хребта, а также в районах Окинавской впадины, бассейна Гуаймас в Тихом океане. Мелководные морские гидротермы распространены в прибрежных зонах островов Вулкано (Италия), Милос (бухта Палеохори, Греция), Кунашир (Курилы, Россия), а также у берегов Японии и Исландии.

Подземные биотопы. К подземным биотопам относятся глубоко залегающие горные породы и термальные воды, которые могут быть доступны на поверхности как образцы пластовых воды шахт, газохранилищ, нефтяных и газовых месторождений. К подземным биоценозам относят также микробные сообщества, развивающиеся в потоках воды на полу или на стенах тоннелей в шахтах глубокого залегания, а также глубинной воды, свободно сочащейся или текущей в подземных выработках. Высокие температуры пластовых вод не связаны с вулканизмом, а отражают температурную зональность пород, которые они насыщают (Крайнов и др., 1992). Водообменные свойства горных пород уменьшаются с

глубиной, и на глубинах 1-3 км подземные воды, в противоположность гидротермам, можно рассматривать как закрытые системы. Подземная гидросфера не представляет собой единого целого, многие её части территориально и геологически отделены друг от друга, а время существования изолированных поровых и трещинных вод может исчисляться десятками миллионов лет (Lippmann et al, 2003). Подземные экосистемы изолированы от поверхности и не основаны на современном фотосинтезе. Источником органического вещества в глубинных водах служит погребенный органический углерод осадочных пород (кероген), органические вещества нефти и природного газа и продукты их распада, CO_2 небиогенного происхождения, органические соединения (метан, углеводороды и др.), химически образующиеся из неорганических веществ (Слободкин и Слободкина, 2014). К богатым органическим веществом местообитаниям можно отнести пластовые воды нефтяных месторождений, антропогенные хранилища природного газа и радиоактивных отходов, но, в общем, для подземных вод характерно низкое содержание углеродных соединений, иногда менее 1 р.р.м. В то же время обнаружение нематод в трещинных водах глубоких шахтах Южной Африки (Borgonie et al, 2011) свидетельствует о значительных количествах бактериальной биомассы, источники углерода и энергии для которой в настоящее время неизвестны. Основными газами подземной гидросферы являются O_2 , N_2 , CO_2 , H_2S , CH_4 , $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$, H_2 , NH_3 , He, Rn и др. (Шварцев, 1996). В качестве самого распространённого неорганического донора электронов, способного служить основой существования глубинных автономных микробных сообществ, обычно рассматривают молекулярный водород. Водород может образовываться в процессах серпентинизации, термического разложения алканов и радиолитического разложения воды (Moody, 1976; Seewald, 2001; Savary & Pagel, 1997).

Вследствие огромного объёма подземной гидросферы, общая биомасса подземных микроорганизмов, по некоторым оценкам, может соперничать с биомассой всей флоры и фауны на поверхности Земли (Gold, 1992; Whitman et al., 1998; McMahon & Parnell, 2014). В то же время это одна из наименее изученных экосистем. Доступ к подземной биосфере

обеспечивается, главным образом, за счет индустриальной деятельности человека: добыча золота, угля, нефти, газа и других полезных ископаемых, захоронение радиоактивных отходов, извлечение термальных вод. Наиболее изученными местообитаниями глубинных подземных микроорганизмов являются нефтяные пласты (Grassia et al., 1996; Magot et al., 2000) включая нефтяные месторождения в Казахстане, Западной Сибири (Россия), Калифорнии (США), Северном море (Норвегия), Китае и Японии (Nazina et al., 1995; Bonch-Osmolovskaya et al., 2003; Orphan et al., 2000; Dahle et al., 2008; Назина и др., 2006; Li et al., 2006; Yamane et al., 2011). Особой проблемой при анализе проб из подземных объектов являются вопросы, связанные с репрезентативностью и стерильностью их отбора. На внутренней поверхности скважин, водозаборных труб и вентилях могут развиваться контаминантные микроорганизмы, не относящиеся к подземной экосистеме (Pedersen et al., 1997; Basso et al., 2005). Эта проблема возникает при отборе проб из вентилях коллекторов шахтовых пластовых вод, подземных газохранилищ, из нефтяных пластов эксплуатируемых месторождений, особенно заводненных, при отборе геотермальных вод из водозаборных скважин. Истинно глубинные микроорганизмы с наибольшей степенью вероятности содержатся в свежееотобранных кернах горных пород, однако, из-за технической сложности и высокой стоимости специальные целевые буровые работы для получения образцов для микробиологических исследований проводятся крайне редко. В нескольких исследованиях были использованы керны, отобранные в различных географических локациях, включая США (штаты Колорадо и Вирджиния), Швецию (Гравберг, Аспо), Японию (Colwell et al., 1997; Fredrickson, 1992; Szewzyk et al., 1994; Pedersen, 1997; Shimizu et al., 2006). Отдельную группу исследуемых объектов составляют микробные маты и осадки сливных каналов геотермальных скважин. Очевидно, что такие экосистемы не являются подземными, однако связаны с таковыми составом вытекающей воды, и некоторые микроорганизмы в них могут иметь глубинное происхождение. Так, термофильные бактерии были выделены из мест разлива геотермальных вод Большого Артезианского Бассейна в Австралии (Ogg & Patel,

2009; 2010) и Парабельской скважины в Томской области (Россия) (Podosokorskaya et al., 2012).

Примерами антропогенных местообитаний термофильных микроорганизмов являются саморазогревающиеся органические материалы (компост, зерно, торф, уголь), системы горячего водоснабжения, сооружения биологической очистки, работающие в термофильном режиме (Beffa et al., 1996; Fuchs et al., 1995; Слободкина и др., 2004).

1.3. Физиологические свойства термофильных микроорганизмов

Отношение к кислороду. Многие термальные местообитания являются либо анаэробными, либо содержащими низкие концентрации кислорода. Это связано с несколькими причинами: удаленностью от атмосферы, низкой растворимостью кислорода в воде при повышенных температурах, наличием восстанавливающих веществ, таких как H_2S , а также потреблением кислорода аэробными организмами, находящимися на поверхности или вблизи нее. Таким образом, в термальных экотопах созданы условия для преимущественного развития анаэробных или факультативно-аэробных микроорганизмов. И действительно, среди описанных видов термофильных прокариот, анаэробы представляют более двух третей. В отсутствие кислорода в качестве конечного акцептора электронов при окислительном фосфорилировании субстрата они могут использовать различные соединения, включая CO_2 , NO_3^- , NO_2^- , NO , N_2O , SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, S^0 , Fe(III) , Mn(IV) , и Mo(VI) (Amend & Shock, 2001). Кроме того, многие анаэробные термофилы могут расти за счет брожения либо без внешнего акцептора электронов, либо используя внешние акцепторы, такие как соединения серы или металлы, для сброса части восстановительных эквивалентов и получения дополнительной энергетической выгоды.

Температура и pH роста. Термофильные микроорганизмы условно делят на несколько дополнительных категорий. К умеренным относят организмы с $T_{\text{опт}}$ 50°C – 64°C , к экстремальным относят, растущие с $T_{\text{опт}}$ 65°C – 79°C , и, наконец, гипертермофильными

называют тех, у которых $T_{\text{опт}} \geq 80^{\circ}\text{C}$ (Wagner & Wiegel, 2008). Подавляющее большинство гипертермофилов представлены археями; среди бактерий только два семейства, *Thermotogaceae* и *Aquificaceae*, имеют гипертермофильных представителей. Археи, имеющие оптимум роста при температурах выше 100°C , были получены из глубоких морских местообитаний. Создаваемое там повышенное давление позволяет воде оставаться жидкой при превышении точки кипения. Все представители семейства *Pyrodictiaceae* (филум *Crenarchaeota*) способны расти при температурах выше 100°C , а самые высокие температуры роста были зафиксированы для видов рода *Pyrodictium* (110°C) и *Pyrolobus* (113°C) (Stetter et al., 1983; Blöchl et al., 1997). Преставитель другого филума, *Euryarchaeota*, *Methanopyrus kandleri* также растет при 110°C (Kurt et al., 1991), и есть сообщение, что другой близкородственный штамм этого вида способен к делению клеток и продукции метана при 122°C (Takai et al., 2008). Нижней границей роста умеренных термофилов является комнатная температура $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$, для экстремальных термофилов это $30\text{-}35^{\circ}\text{C}$, а для гипертермофилов - $45\text{-}50^{\circ}\text{C}$, хотя многие не растут при температурах ниже 70°C , а *Pyrolobus fumarii* не может расти, если температура не превышает 90°C (Blöchl et al., 1997). Разница между минимальной и максимальной температурами роста обычно составляет $20\text{-}40^{\circ}\text{C}$, однако есть и исключения. Так, в очень узком диапазоне растут *Anaerolinea thermophila* (от 50 до 60°C) и *Ignisphaera aggregans* (от 85 до 98°C); тогда как *Kosmotoga olearia* растет в интервале от 20 до 80°C (Sekiguchi et al., 2003; Niederberger et al., 2006; DiPippo et al., 2009).

Большинство термофильных прокариот являются нейтрофилами, то есть имеют $\text{pH}_{\text{опт}}$ около 7.0. Термофилов, активно развивающихся в кислых или щелочных условиях, называют полиэкстремофилами (термоацидофилами или термоалкалифилами). Термофильные бактерии, растущие при pH ниже 3.0 неизвестны; наиболее ацидофильными являются *Thermoanaerobacterium aotearoense*, диапазон $\text{pH}^{60^{\circ}\text{C}}$ роста составляет 3.8–6.8 и $\text{pH}^{60^{\circ}\text{C}}_{\text{опт}}$ 5.2 (Liu et al., 1996) и *Thermoanaerobacterium aciditolerans* с диапазоном pH 3.2–7.1 и $\text{pH}_{\text{опт}}$ 5.7 (Kublanov et al., 2007). Археи могут развиваться в значительно более кислых условиях.

Наиболее ацидофильными являются представители семейств *Thermoplasmataceae* и *Sulfolobaceae*, почти все они факультативные аэробы. Самый низкий pH роста 0.35-3.0 и pH_{opt} 0.8-1.4 отмечен у *Acidianus sulfidivorans* (Plumb et al., 2007). Напротив, способность к росту в щелочной области известна для большего числа бактерий, чем архей. *Methanothermobacter thermoflexus*, относящийся к семейству *Methanobacteriaceae*, филум *Euryarchaeota*, растет в слабощелочных условиях и имеет pH_{opt} 7.9-8.2 (Kotelnikova et al., 1993; Woone, 2001). Все археи, имеющие pH_{opt} выше 8.5, относятся к семейству *Thermococcaceae* (филум *Euryarchaeota*), включая *Thermococcus acidaminovorans* с pH роста 5.0–9.5 и pH_{opt} 9.0 (Dirmeier et al., 1998) и *Thermococcus alcaliphilus* с pH роста 6.5–10.5 и pH_{opt} 9.0 (Keller et al., 1995). Почти все алкалитермофильные анаэробные бактерии - это представители класса *Clostridia* (филум *Firmicutes*). К наиболее алкалифильным относятся *Clostridium paradoxum* и *Cl. thermoalcaliphilum*, растущие до pH 11 и имеющие pH_{opt} 10.1 (Li et al., 1993; 1994). Интересным примером полиэкстремофилов служит выделенная из озера Вади Ан Натрун (Египет) бактерия *Natranaerobius thermophilus*, которая является и термофилом (T_{opt} 53°C), и алкалифилом (pH_{opt}^{55C} 9.5), и галофилом (Na^+_{opt} 3.3-3.9 М) (Mesbah et al., 2007). Как и в случае с температурой, диапазон pH роста сильно варьирует у разных организмов. Например, *Thermococcus hydrothermalis* растет при pH 3.5–9.5 (Godfroy et al., 1997), а *Pyrococcus glycovorans* - при pH 2.5–9.0 (Barbier et al., 1999). При этом есть термофилы, имеющие очень узкий, менее единицы, интервал pH роста, в том числе *Thermodesulfatator indicus* с pH роста 6.0–6.7 (Moussard et al., 2004) или *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum*, который растет при pH 6.3–6.8 (L'Haridon et al., 2002).

Механизмы тепловой адаптации. Молекулярные механизмы устойчивости к высоким температурам до сих пор не выяснены, и могут различаться в зависимости от филогенетического положения каждого организма. У термофилов меньше межгенной ДНК, что делает их геномы более компактными. В их белках выше содержание более коротких

аминокислот (изолейцин, валин, триптофан и др.), что отражает важность более жесткой первичной структуры (Urbietta et al., 2014). Адаптация к высоким температурам включает в себя наличие термостабильных белков, повышенное содержание белков теплового шока и шаперонов, участвующих в сборке макромолекул, эффективную систему репарации ДНК и быстрый ресинтез термочувствительных соединений. Адаптация клеточных мембран включает в себя наличие полиаминов, поддерживающих их стабильность, более высокое содержание липидов с насыщенными жирными кислотами у бактерий или наличие у архей липидного монослоя, устойчивого к гидролизу при высоких температурах или кислотности среды. Обнаруженные у архей гистоноподобные белки, связывающиеся с ДНК, могут служить для увеличения ее термостабильности. Кроме того, у гипертермофильных микроорганизмов обнаружен особый белок - обратная гираза, который отсутствует у мезофильных прокариот. Этот фермент предотвращает раскручивание двойной спирали молекулы ДНК при высоких температурах и поддерживает ее в функциональном состоянии. Вторичная структура РНК, по-видимому, стабилизирована высоким содержанием гуанина и цитозина (Stetter, 1999; Lewin et al., 2013). Считается также, что в ходе приспособления организмов к внешней среде с высокими температурами важную роль играет горизонтальный перенос генов. Это объясняет значительные фенотипические различия у близкородственных организмов, например, у мезофильного устойчивого к радиации *Deinococcus radiodurans* и термофильного, но радиационночувствительного *Thermus thermophilus* (van Wolferen et al., 2013). Горизонтальный перенос генов подтверждается также наличием у гипертермофильных бактерий мегаплазмид и многих генов архейного происхождения. Так, в геномах *Aquifex aeolicus* и *Thermotoga maritima* содержится 16.2 и 24 % таких генов (Aravind et al., 1998).

Метаболическое разнообразие. Метаболические свойства термофильных бактерий и архей крайне разнообразны. В термальных экосистемах они образуют сложные пищевые цепи и могут выполнять функции первичных продуцентов и/или потребителей

органического вещества. Хемоорганогетеротрофы, вследствие более легкого культивирования, составляющие большую часть всех выделенных термофильных бактерий, используют в качестве источника углерода и энергии различные органические соединения. В их число входят сахара, в том числе такие сложные полисахариды, как хитин, ксилан, целлюлоза, а также аминокислоты и белковые соединения, органические кислоты и жирные кислоты, включая длинноцепочечные (Canganella & Wiegel, 2014). Органотрофные термофилы могут расти за счет разных типов дыхания или брожения. Основными продуктами гликолитического брожения являются ацетат, лактат, этанол, молекулярный водород и CO_2 .

Хемолитоавтотрофный метаболизм довольно часто встречается у архей и бактерий. Важнейшим донором электронов является молекулярный водород. В аэробных условиях бактерии филумов *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Aquificae*, а также археи порядка *Sulfolobales* способны окислять его до воды. В отсутствие кислорода акцепторами электронов служат окисленные формы неорганических соединений, таких как азот, сера, мышьяк, железо и марганец. Особыми видами окисления водорода в анаэробных условиях являются реакции с образованием метана или ацетата, где акцептором электронов является углекислота. Метаногенез осуществляют археи филума *Euryarchaeota*, к ацетогенезу способны бактерии рода *Moorella*. Другой интересной разновидностью хемолитоавтотрофного метаболизма является рост на CO с образованием водорода (Sokolova et al., 2009). Термофильные и гипертермофильные представители порядков *Aquificales* и *Sulfolobales*, а также классов *Alfa-*, *Beta-* и *Gamma**proteobacteria* способны окислять элементную серу и ее соединения до серной кислоты с кислородом или нитратом в качестве акцептора электронов (Stetter, 1999; Caldwell et al., 1976; Nakagawa et al., 2004; Götz et al., 2002; Nunoura et al., 2008; Takai et al., 2003a; 2008). *Ferroglobus placidus* способен использовать ион двухвалентного железа в качестве донора электронов при восстановлении нитрата (Hafenbradl et al., 1996). Некоторые хемолитоавтотрофы являются факультативными и могут использовать для роста

органические вещества. Известны также хемолитогетеротрофные термофильные анаэробы, неспособные к фиксации CO₂, например, археи *Archaeoglobus profundus* и *Stetteria hydrogenophila* и бактерии родов *Desulfotomaculum*, *Thermincola*, *Oceanithermus*, *Vulcanithermus*, *Caldithrix* (Wagner & Wiegel, 2008). Фототрофные термофилы представлены несколькими бактериями, относящимися к филумам *Proteobacteria*, *Chloroflexi* и *Firmicutes*. Все они являются умеренными термофилами, видимо, из-за температурной чувствительности фотосистемы (Amend & Shock, 2001).

1.4. Таксономическое разнообразие

Интенсивные исследования термофильных микроорганизмов, главным образом, анаэробных, начались с конца 70х годов XX в. За это время каждое десятилетие количество публикаций с описаниями новых видов увеличивалось примерно вдвое. В настоящее время выделено в чистую культуру и охарактеризовано более 750 видов термофильных прокариот, около двух третей из которых являются анаэробными. Археи составляют примерно пятую часть этого количества и представлены двумя филумами *Crenarchaeota* и *Euryarchaeota* (Таблица 1). Практически все известные культивируемые *Crenarchaeota* являются гипертермофилами и не растут при температурах ниже 55-60°C. Исключением являются несколько представителей родов *Acidianus*, *Caldisphaera*, *Sulfolobus* и *Thermocodium*, имеющие T_{опт} 70-75°C, а также наиболее «низкотемпературный» *Fervidicoccus fontis* с T_{опт} 65-70°C (Zillig et al., 1980; Itoh et al., 1998; 2003; Perevalova et al., 2010). Анаэробные гипертермофилы, образующие порядки *Archaeoglobales* и *Thermococcales*, а также термофильные представители метаногенных архей и члены порядка *Thermoplasmatales* входят в филум *Euryarchaeota*. Среди известных на сегодняшний день 30 филумов бактерий (Parte, 2014, <http://www.bacterio.net>), 22 имеют термофильных представителей. Больше всего термофилов (около 300 видов) относятся к филуму *Firmicutes*, в котором два порядка, *Thermoanaerobacterales* и *Thermolithobacterales*, представлены исключительно

термофильными анаэробами. Исключительно термофилами как аэробными, так и анаэробными, среди которых есть и гипертермофилы, представлен филум *Aquificae*. Анаэробные термофильные бактерии образуют филум *Thermodesulfobacteria*, а также филумы *Caldiserica*, *Calditrichaeota*, *Dictyoglomia* и *Ignavibacteriae*, состоящие из одного или двух членов.

Филум *Thermotoga* долгое время включал в себя только термофильные и гипертермофильные виды, однако в 2012 году был выделен первый мезофил *Mesotoga prima* ($T_{\text{опт}}$ 37°C) (Nesbø et al., 2012), а затем еще один, *Mesotoga infera* ($T_{\text{опт}}$ 45°C) (Ben Hania et al., 2013). Среди протеобактерий наибольшее количество термофилов находятся в классах *Delta*- и *Epsilonproteobacteria*.

Таблица 1. Таксономическое разнообразие термофильных прокариот, восстанавливающих железо, нитрат и сульфат

Филум	Анаэробы		Аэробы		Число видов, восстанавливающих		
	Количество видов	T _{опт} (°C)	Количество видов	T _{опт} (°C)	Fe(III)	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
<i>Crenarchaeota</i>	53	70-106	13	65-95	8	4	3
<i>Euryarchaeota</i>	81	50-103	5	60	8	1	4
<i>Acidobacteria</i>	2	55-60	2	51-65	1	-	-
<i>Actinobacteria</i>	1	50	23	50-55	2	-	-
<i>Aquificae</i>	17	63-85	13	75-89	2	13	-
<i>Bacteroidetes</i>	2	50	8	50-60	-	нд	-
<i>Caldiserica</i>	1	65	-		-	-	-
<i>Chloroflexi</i>	8	50-74	10	58-76	1	-	-
<i>Calditrichaeota</i>	1	60	-	-	-	+	-
<i>Deferribacter</i>	5	55-63	-		3	5	-
<i>Deinococcus-Thermus</i>	4	60-70	24	65-75	1	4	-
<i>Dictyoglomi</i>	2	78	-		-	нд	-
<i>Firmicutes</i>	205	50-78	93	50-80	37	41	24
<i>Ignavibacteriae</i>	1	50	-		1	-	-
<i>Nitrospirae</i>	5	50-65	-		-	1	5
<i>Planctomycetes^a</i>	4	50-60	-		-	3	-
<i>Proteobacteria</i>	39	50-65	41	50-60	5	15	9
<i>Spirochaetes</i>	1	50	-		-	-	-
<i>Synergistetes</i>	4	55-63	-		-	-	-
<i>Thermodesulfobacteria</i>	11	65-87	-		2	2 ^a	7
<i>Thermotoga</i>	44	50-80	-		6	нд	1
<i>Verrucomicrobia</i>	-		1	60-65	-	-	-

Приведены литературные данные на 01.01.2017

^aк началу настоящей работы данные отсутствовали.

Сокращения: нд- нет данных

Альтернативным подходом к исследованию филогенетического разнообразия микроорганизмов является использование методов, не связанных с культивированием, а основанных на использовании гена 16S рРНК в качестве филогенетического маркера. Пионерские работы в этой области очень быстро привели к революционным изменениям в таксономии микроорганизмов и всех живых организмов, и разделению их на три домена: *Bacteria*, *Archaea* и *Eucarya* (Woese & Fox, 1977; Woese et al., 1990). Благодаря широкому использованию молекулярных методов стало возможным образование новой научной дисциплины - микробной молекулярной экологии, которая существенно расширила знания о микробном филогенетическом разнообразии, и показала, что пока физиологически охарактеризована только очень небольшая часть (1-10%) обитающих в окружающей среде прокариот. Скорость развития методов и технологий секвенирования в последние два десятилетия поражает. Первый автоматический секвенатор, использовавший метод Сэнгера, 96-капиллярный ABI Prism 3700 DNA Analyzer появился на рынке в 1998 году, ознаменовав начало высокопродуктивного секвенирования. Меньше, чем через 10 лет, в 2005 и 2007 появились новые платформы для секвенирования, Roche/454 GS FLX и Illumina Genome Analyzer (первоначально называемая Solexa) (Kircher & Kelso, 2010). Производительность этих приборов в 100-1000 раз выше капиллярного, поэтому с расширением их использования в обиход и в литературу вошел термин «секвенирование нового поколения» (Mardis, 2008; Ansorge, 2009). С развитием этих методов снизилась стоимость, время и трудоёмкость анализа, что позволило существенно расширить их использование в изучении филогенетического разнообразия микробных сообществ. Многие высокотемпературные экосистемы стали объектами таких исследований, в том числе наземные горячие источники (Klatt et al., 2011; López-López et al., 2013; Amin et al., 2017), нефтяные месторождения (Kotlar et al., 2011; Li et al., 2013), глубоководные морские гидротермы (Huber et al., 2007; Voordeckers et al., 2008; Nunoura & Takai, 2009; Xie et al., 2011; Flores et al., 2011, 2012). Подробно исследованные за последние 10-20 лет термальные биотопы и примененные

методы представлены в обзорах (Lewin et al., 2013; Urbietta et al., 2014; DeCastro et al., 2016). Как и в более ранних работах, в этих исследованиях было выявлено большое количество филоотипов, имеющих лишь отдаленное сходство с генами 16S рРНК известных прокариот, особенно это касается архей в глубоководных экосистемах. Однако, в отсутствие культивирования нет твердой уверенности в том, что полученные филоотипы принадлежат термофильным микроорганизмам. В частности, обнаружено, что доминирующей группой бактерий в морских глубоководных биотопах являются *Epsilonproteobacteria*, известные представители которых включают в себя и термофилов, и мезофилов. Надежных и однозначных маркеров термофилии в настоящее время нет, хотя существуют указания, что им может быть G+C состав гена 16S рРНК (Kimura et al., 2006; 2007, Merkel et al., 2013). В некоторых случаях из последовательностей, полученных в ходе метагеномных анализов, удается реконструировать полные геномы индивидуальных микроорганизмов и их вероятный метаболизм. Так, из метагенома микробного сообщества нефтяного месторождения в Австралии (температура в скважине 102°C) были собраны геномы наиболее распространенных в нем бактерий - *Thermotoga maritima* A7A, *Desulfonauticus* sp. A7A и *Thermoanaerobacter* sp. A7A (Li et al., 2013). Термофильность этих бактерий не вызывает сомнений, не только из-за температуры в месте отбора пробы, но и поскольку они имели очень высокую степень сходства гена 16S рРНК (99-100%) с ближайшими родственными организмами с известной физиологией. Из нуклеотидных последовательностей метагеномов, полученных из воды или мата золотодобывающих шахт в ЮАР и Японии были собраны индивидуальные геномы бактерии *Candidatus 'Desulforudis audaxviator'* (Chivian et al., 2008) и археи *Candidatus 'Acetothermum autotrophicum'* (Takami et al., 2012), относящейся к подразделению некультивируемых архей OP1, детектированному в Йеллоустонском Национальном парке (Hugenholtz et al., 1998). Предположения о термофильности были сделаны (в первом случае) на основании геохимического и термодинамического анализа

места отбора пробы или (во втором случае) на основании высокого G+C состава гена 16S рРНК.

Все более глубокое погружение в эру молекулярно-экологических методов не снижает роли традиционных культивационных подходов. Очевидно, что информация, полученная в ходе анализа геномных данных, является лишь гипотетической и требует экспериментальной проверки, и пока наиболее доступным и прямым средством верификации служит работа с чистыми культурами. Усилия в этом направлении позволяют выделить все новые термофильные изоляты, которые ранее были детектированы молекулярными методами. В качестве примеров можно привести *Nautilia lithotrophica* (Miroshnichenko et al., 2002), *Sulfurihydrogenibium subterraneum* (Takai et al., 2002; 2003), '*Aciduliprofundum boonei*' (Reysenbach et al., 2006), *Caldisericum exile* (Mori et al., 2009). Полученные новые микроорганизмы можно использовать для физиологических и экологических исследований, а также для полногеномного секвенирования и расширения базы референсных геномов для последующих анализов. С другой стороны, геномные и метагеномные данные способны выявить скрытый метаболический потенциал, пути обмена веществ и схемы регуляции как для культивируемых, так и для некультивируемых микроорганизмов. Выделение микроорганизмов и поддержание их в лабораторных условиях вместе с информацией полных геномов и метагеномики представляют мощную комбинацию для исследований микробного разнообразия.

1.5. Роль и возможные пути метаболизма термофильных анаэробных прокариот в древней биосфере

Тема древней биосферы и ранней эволюции, видимо, всегда будет дискуссионной, поскольку полной и достоверной информации о климате, геологической и физико-химической ситуации на Земле 3-4 миллиарда лет тому назад практически нет. Основная полемика развивается вокруг нескольких вопросов: были ли ранние формы жизни (1)

термофильными или мезофильными, (2) автотрофными или гетеротрофными, (3) появились ли эукариоты до, после или вместе с прокариотами (Martin & Sousa, 2016). Каждая точка зрения имеет своих сторонников и свои доказательства, тем не менее, в настоящее время доминирует гипотеза, о том, что (1) последний универсальный предшественник живых организмов был, если не гипертермофилом (Stetter, 1996; Weiss et al., 2016), то термофилом или умеренным термофилом (Boussau et al., 2008). (2) Первые организмы были автотрофами, и наиболее древним путем фиксации CO₂ (из ныне известных) считается ацетил-КоА (или Вуда-Льюнгаля) путь (Fuchs, 2011). (3) Эволюция клеточных систем шла по пути усложнения, от прокариот к эукариотам (Martin et al., 2015). С этими предположениями хорошо согласуется модель гидротермального происхождения жизни (Martin & Russell, 2006). Согласно этой модели, первые самовоспроизводящиеся системы могли существовать в микропорах осадков моносульфида железа (FeS), обладающих каталитической активностью (Koonin & Martin 2005). Такие осадки могли образовываться при взаимодействии богатого сульфидом горячего щелочного гидротермального флюида с Fe(II)-содержащими водами древнего океана. Продукты пребиотического синтеза, катализируемого FeS, могли концентрироваться до необходимых количеств в этих природных ячейках, не вымываясь в океан, и, таким образом могли служить предшественниками клеточных стенок и мембран современных прокариот (Russel et al., 1994; Russell & Hall 1997). Единственный пункт, не вызывающий споров - это то, что древние экосистемы Земли существовали в бескислородном мире, и поддерживались за счет анаэробного метаболизма. Есть свидетельства существования смешанных фототрофных и хемотрофных (восстанавливающих соединения серы) микробных сообществ в отложениях возрастом 3.3 - 3.4 миллиарда лет (Tice et al., 2004; Westall et al., 2015), тогда как накопление атмосферного кислорода датируется не ранее 2.3-2.5 миллиардов лет назад (кислородная революция, Great Oxidation Event) (Lyons et al., 2014). В качестве первых энергодающих реакций, поддерживавших жизнь, предлагаются и ацетогенез, и метаногенез, и железоредукция, и

восстановление соединений серы, а также аноксигенный фотосинтез с неорганическими донорами электронов (Pedersen, 1997; Martin & Sousa, 2016; Lovely et al., 2004; Canfield et al., 2006). Наиболее вероятные доноры и акцепторы электронов – водород, углекислый газ и монооксид углерода, различные формы серы, железа и азота, имевшие вулканическое происхождение. Важнейшим компонентом экосистем был водород, который выделялся из наземных или подводных вулканов и служил донором электронов для аноксигенного фотосинтеза, метаногенеза, ацетогенеза и реакций восстановления окисленных форм железа, серы и азота. Анализ белковых последовательностей в геномах почти 2 миллионов прокариот представляет последнего общего предка (LUCA) как строго анаэробного H₂-зависимого термофильного азотфиксирующего автотрофа, использующего путь Вуда–Льюнгаля для CO₂ фиксации и обитающего в гидротермах, богатых H₂, CO₂, серой, металлами с переходной валентностью и активными C1-соединениями (Weiss et al., 2016).

Сера могла попадать в окружающую среду ранней Земли несколькими путями. Сероводород и сернистый газ выделялись из наземных или подводных вулканов. Предполагается, что древний океан содержал большие количества растворенного Fe²⁺, который связывал поток выделяющегося из глубоководных гидротерм сероводорода (Canfield, 2004). Следовательно, основным источником серных соединений были наземные зоны вулканизма и гидротермы. Элементарная сера не имеет прямого вулканического происхождения, однако могла образоваться в атмосфере путем фотолиза сернистого газа и оседать на поверхности Земли, главным образом, в виде S₈ (Ono et al., 2003). Элементарная сера могла служить и донором электронов для аноксигенного фотосинтеза, и акцептором для восстановительных реакций.

Значительные количества двухвалентного железа в древнем океане были результатом гидротермальной активности срединно-океанических хребтов, а также вымывания из земной коры под воздействием атмосферных осадков. Облучение поверхности океана ультрафиолетовыми лучами, значительно более мощное, чем в настоящее время, могло

приводить к фотохимическому окислению двухвалентного железа. Оно также могло окисляться железooksисляющими фототрофами. Образовавшееся трехвалентное железо могло вновь восстанавливаться железовосстанавливающими хемотрофными бактериями (Canfield et al., 2006).

Первичными источниками азота в аноксигенных условиях могли быть аммоний, образующийся в системах гидротермальной циркуляции срединно-океанических хребтов, в ходе восстановления молекулярного азота при высоких температурах, а также оксид азота (NO). В бескислородной атмосфере ранней Земли, основным компонентом которой был азот, оксид азота, образующийся при разрядах молний, восстанавливался водородом до нитроксила (HNO), который затем разлагался в воде до нитрита и нитрата (Mancinelli & McКау, 1988). Высказываются предположения, что в ранней биосфере именно NO и его производные, нитрит и нитрат, были главными окислителями. Действуя как акцепторы электронов, они обеспечивали функционирование энергетического метаболического пути, сходного с современной денитрификацией. Аэробное дыхание в этих моделях рассматривается как эволюция этого пути за счет адаптации NO-редуктазы к новому субстрату, кислороду (Castresana & Saraste, 1995; Ducluzeau et al., 2009).

Хотя ранние формы жизни не сохранились, существующие ныне природные термальные биотопы обладают характеристиками, близкими к тем, в которых, предположительно зародилась жизнь, и могут, следовательно, рассматриваться как аналоги древних биотопов (Заварзин и др., 1989). Обитающие в них термофильные анаэробы могут служить моделью ранних форм жизни, поскольку, вероятно, они имеют сходные свойства. Реконструкция предполагаемых путей конструктивного и энергетического обмена у древнейших форм жизни и их эволюции основаны на изучении физиологии и метаболизма современных термофильных анаэробных прокариот.

1.6. Возможности использования термофилов в биотехнологии

Для многих промышленных процессов требуются высокие температуры, что делает термофильные и гипертермофильные микроорганизмы прекрасными кандидатами для применения (Mehta et al., 2016). Для биотехнологических целей используют живые организмы (чистые культуры или микробные консорциумы) или их макромолекулы и метаболиты. К технологиям, использующим целые клетки, относятся биосорбция и иммобилизация токсичных металлов и радионуклидов, разложение ароматических соединений и углеводов, производство компоста, обогащение кормов, биовыщелачивание руд, производство биотоплива. Биотопливо образуется в результате сбраживания микроорганизмами богатого углеводами растительного сырья с образованием спиртов и/или водорода. В этих процессах используют бактерии родов *Clostridium*, *Caldanaerobius* или *Caldicellulosiruptor* или смешанные культуры, в частности, *Clostridium thermocellum* и *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Wagner & Wiegel, 2008). Производство биотоплива с использованием термофилов казалось весьма перспективным, но его эффективность оказалась ниже промышленных потребностей. В настоящее время, однако, административно поддерживаемый переход от использования горючих ископаемых к альтернативным возобновляемым источникам энергии обуславливает бурное развитие биоэнергетики и открывает новые возможности для исследований с целью применения термофильных микроорганизмов в производстве биоэтанола, биодизеля, а также биогаза (Scully & Orlygsson, 2015).

Для биовыщелачивания руд в настоящее время используются ацидофильные прокариоты с оптимальной температурой роста, не превышающей 45°C. Исследования последних лет указывают на преимущества применения термоацидофильных архей родов *Acidianus*, *Metallosphaera* и *Sulfolobus* (Li et al., 2014). Для очистки горячих стоков от тяжелых металлов, таких как медь, кадмий, никель, цинк, хром и марганец, могут быть использованы различные виды бактерий родов *Bacillus*, *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Thermus*, а

также архея *Thermococcus zilligii* (Слободкина и др., 2007; Chatterjee et al., 2010; Sar et al., 2013). Термофильные микроорганизмы при наличии органических или неорганических доноров электронов восстанавливают окисленные формы тяжелых металлов. При этом металлы переходят в менее токсичное и менее растворимое состояние, и выводятся из стоков в виде осадков.

Особенный интерес исследователей к термофилам, обусловлен наличием у них термостабильных ферментов, получивших название термозимы. Биотехнологии с их использованием могут найти применение в различных областях, включая целлюлозно-бумажное производство, сельское хозяйство, текстильную, пищевую и фармацевтическую промышленность, а также медицину и медицинскую диагностику. Одним из первых примеров успешного коммерческого использования термостабильных ферментов являются ДНК-полимеразы и ДНК лигазы. Выделение *Taq* ДНК полимеразы из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*, и особенно получение рекомбинантного белка, было революционным событием в биотехнологии (Chien et al., 1976; Каледин и др., 1980). Позднее появились обладающие более высокой точностью присоединения нуклеотидов *Pfu* и *Vent* ДНК полимеразы, выделенные из гипертермофильных архей *Pyrococcus furiosus* и *Thermococcus litoralis* (Lundberg et al., 1991; Mattila et al., 1991; Cariello et al., 1991). Налажено также коммерческое производство термостабильных ДНК лигаз - *Pfu* из *P. furiosus* (Stratagene, США) и *Tcs* из *Thermus scodoductus* (Roche Molecular Biochemicals, Швейцария).

Термостабильные ферменты (оптимальная активность при температуре 60°-80°С) имеют ряд технологических преимуществ перед мезофильными (оптимальная активность при температуре 25°-50°С): (1) термостабильность обычно сопровождается более высокой устойчивостью к экстремальным значениям рН, высокому давлению, химическим денатурантам и органическим растворителям; (2) очистка этих ферментов значительно легче, так как после экспрессии в мезофильных клетках-хозяевах все белки, кроме целевых можно удалить простым нагревом препаратов; (3) проведение ферментативных реакций при более

высоких температурах повышает скорости реакций и позволяет повысить растворимость и увеличить концентрации субстратов, снизить вязкость, уменьшить риск микробного загрязнения (Vielle & Zeikus, 2001; DeCastro et al., 2016). Наиболее востребованными для промышленности являются гидролитические ферменты – целлюлазы, ксиланазы, пектиназы, хитиназы, амилазы, пуллуланы, протеазы, липазы и эстеразы (Urbietal et al., 2014; Elleuche et al., 2015; DeCastro et al., 2016). Ферменты, разлагающие белки и крахмал составляют до 90% мирового рынка промышленных ферментов (Bouzas et al., 2006; Van der Maarel et al., 2002). Первые термостабильные бактериальные амилазы, сохраняющие активность до 60°C, были выделены из *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis* (Haki & Rakshit, 2003). В настоящий момент к ним прибавились еще несколько коммерчески доступных препаратов, в том числе Valley "Ultra-thin™" (Valley Research/Diversa, США), Multifect AA 21L® и OPTIMAX® (Genencor, США), Termamyl®/Liquozyme® и Fungamyl® (Novozymes, Дания). Эти ферменты максимально активны при 82-86°C (Termamyl®/Liquozyme®) и даже 105°C (Valley "Ultra-thin™") (Turner et al., 2007; Richardson et al., 2002). Применяемые сегодня промышленные целлюлазы, ксиланазы, хитиназы, пектиназы, протеазы, липазы сохраняют каталитическую активность при температурах не выше 50-60°C.

Термостабильные ферменты получают либо из клеток или культуральной жидкости термофильного штамма-продуцента (Fuciños et al., 2011; Sen et al., 2011) либо, что более эффективно, после экспрессии рекомбинантного белка в мезофильных клетках-хозяевах (Слободкина и др., 2005; Shi et al., 2013; Fuciños et al., 2014). Современные технологии позволяют вообще избежать сложной во многих отношениях стадии культивирования анаэробных термофильных организмов. Большое число полноразмерных генов в базах данных позволяют найти и химически синтезировать нужную последовательность гена белка с предполагаемой активностью, а затем клонировать и экспрессировать этот ген в клетках *E.coli*. Таким способом, например, были получены два термостабильных фермента, эстераза и НАДФ-зависимая альдегид-дегидрогеназа, из гипертермофильной археи *Pyrobaculum* sp.1860 (Shao et al., 2014; Bezsudnova et al., 2016). Новое поле для поиска биокатализаторов,

не требующих культивирования, открывают метагеномные исследования. Неоспоримым преимуществом такого подхода является возможность выделения белков из некультивируемых микроорганизмов. Одна из стратегий анализа метагеномов для поиска термозимов основана на использовании консервативных (аминокислотных или нуклеотидных) последовательностей интересующего белка/семейства белков. Гены из метагенома амплифицируются с помощью специально созданных праймеров с последующим клонированием и экспрессией целевого белка. Таким путем был получен ряд термостабильных гликолитических ферментов, включая целлюлазу, ксиланазу, пектиназу, амилазу, а также фитаза, нитрилаза, полимеразы (DeCastro et al., 2016). Другая стратегия состоит в клонировании природной ДНК в экспрессионные векторы и перенос их в клетки-хозяева. Колонии, выросшие в заданных условиях, и, следовательно, обладающие ферментами с нужной активностью, отбираются. После определения нуклеотидной последовательности искомого гена, он амплифицируется, клонируется и затем экспрессируется. Такой подход позволяет получить ферменты с новыми первичными структурами, которые нельзя предсказать, исходя из секвенирования ДНК. С помощью функционального метагеномного подхода был выделен ряд липаз, эстераз, гликозидаз, амилаз, протеаз, оксидоредуктаз (DeCastro et al., 2016).

Объем мирового рынка биотехнологий на сегодняшний день оценивается в 270 млрд. долларов, а прогнозируемые темпы роста составляют 10-12% в год до 2020 года. На биофармацевтику («красные» биотехнологии) приходится около 60% объема мирового рынка, на промышленные биотехнологии («белые», в т.ч. биоэнергетика) – около 35%, на агrobiотехнологии («зеленые») и на природоохранные («серые») биотехнологии – оставшиеся 5%. Доля России на мировом рынке составляет менее 0,1% (Frost & Sullivan, 2014). По состоянию на 2013 год, объем российского рынка промышленных ферментных препаратов оценивался в 183 млн. долларов, тогда как мировой рынок еще в 2004 году оценивался в 2 млрд. долларов (Business Communications Company Inc).

Из вышеизложенного следует, что термофилы и термостабильные ферменты вызывают большой интерес, как в качестве аналитических инструментов, так и в качестве

биокатализаторов для индустриального применения. На сегодняшний день, несколько десятков термостабильных ферментов выделено и охарактеризовано в лабораторных условиях, в том числе с использованием новейших методов (Elleuche et al., 2015; DeCastro et al., 2016). Однако применение этих ферментов, несмотря на множество усилий, ограничено, в-основном, их себестоимостью. Ожидается, что потребности технологических процессов в полиэкстремофильных биокатализаторах в перспективе смогут вызвать рост рынка ферментов, что, в свою очередь, приведет к их производству в более высоких объемах, и как следствие, снижению стоимости. Более того, происходящая из-за дороговизны углеводов, а также в стремлении снизить вред окружающей среде, смена парадигмы в энергетике, создает предпосылки для серьезного наращивания производства биотоплива, получаемого из возобновляемых источников (биомассы). Правительства многих стран устанавливают обязательный целевой индикатор по использованию биоэтанола/биодизеля в смеси с обычным топливом. Такие меры также приводят к увеличению потребности в термостабильных микробных биокатализаторах.

ГЛАВА 2. БИОГЕОХИМИЧЕСКИЕ ЦИКЛЫ АЗОТА, СЕРЫ И ЖЕЛЕЗА И УЧАСТИЕ В НИХ ТЕРМОФИЛЬНЫХ АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Основой самоподдержания жизни на Земле являются биогеохимические циклы. Процессы создания органического вещества, аккумулирующего энергию, и противоположные процессы его разложения с высвобождением этой энергии одинаково необходимы для существования жизни. Круговорот веществ происходит в биогеоценозе со времени зарождения на Земле жизни и является неременным условием её существования. Он осуществляется на всех уровнях – от молекулярного до биосферного. Все основные элементы, необходимые для жизни, подвергаются циклическим превращениям. Круговорот веществ определяется ведущим циклом углерода и сопряженными с ним циклами неорганических элементов, таких как кислород, азот, сера, железо, фосфор, кальций, кремний (Заварзин, 2004). Часть химических элементов и их соединений постоянно выпадает из общей циркуляции и скапливается вне организмов, создавая своего рода запасы биогенных веществ. Так были накоплены кислород и азот в атмосфере, горючие ископаемые и другие породы земной коры. Основополагающая роль в циклических превращениях основных биогенных элементов принадлежит прокариотам (бактериям и археям). Определенные этапы циклов осуществляют исключительно прокариоты. В биосфере в результате жизнедеятельности микроорганизмов в больших масштабах осуществляются такие химические процессы, как окисление и восстановление элементов с переменной валентностью (азот, сера, железо, марганец и др.). Геологические результаты деятельности этих организмов проявляются в образовании осадочных месторождений серы, образовании в анаэробных условиях залежей сульфидов металлов, а в аэробных – окисление их и перевод в растворимое состояние, возникновение железных и железомарганцевых руд (Кузнецов, 1959; Гиляров, 1989; Чернова и Былова, 2004).

2.1. Цикл азота и термофильные нитратвосстанавливающие прокариоты

Азот является химическим элементом, необходимым для существования животных и растений, он входит в состав белков, аминокислот, нуклеиновых кислот, нуклеопротеидов, хлорофилла, гемоглобина и др. Основным резервуаром азота в биосфере является воздушная оболочка. Запас азота (N_2) в атмосфере огромен (78% от ее объема). Для обеспечения живых организмов азотом в форме, пригодной для катаболического и энергетического метаболизма (NH_4^+), необходима фиксация азота — процесс, который могут осуществлять только микроорганизмы. Далее азот закрепляется в органическом веществе (в белках, нуклеиновых кислотах и пр.) и передается по цепям питания. Азот, включённый в состав живых существ, после их гибели минерализуется с образованием, главным образом, аммонийных соединений, которые вновь могут использоваться как микро-, так и макроорганизмами.

2.1.1. История исследований микробной трансформации соединений азота

Представления об участии микроорганизмов в круговороте азота сложились еще в XIX веке, благодаря работам Бейеринка, Виноградского, Гайона и Дюпети (Рисунок 1А). Ими были обнаружены и описаны основные этапы цикла: фиксация атмосферного азота свободноживущими или симбиотическими почвенными бактериями (Winogradsky, 1883; Beijerinck, 1888; 1901); двухстадийное окисление аммония до нитрата (нитрификация) (Winogradsky, 1890; 1894); и замыкающее цикл восстановление нитрата в газообразный азот (денитрификация) (Gayon & Dupetit, 1886).

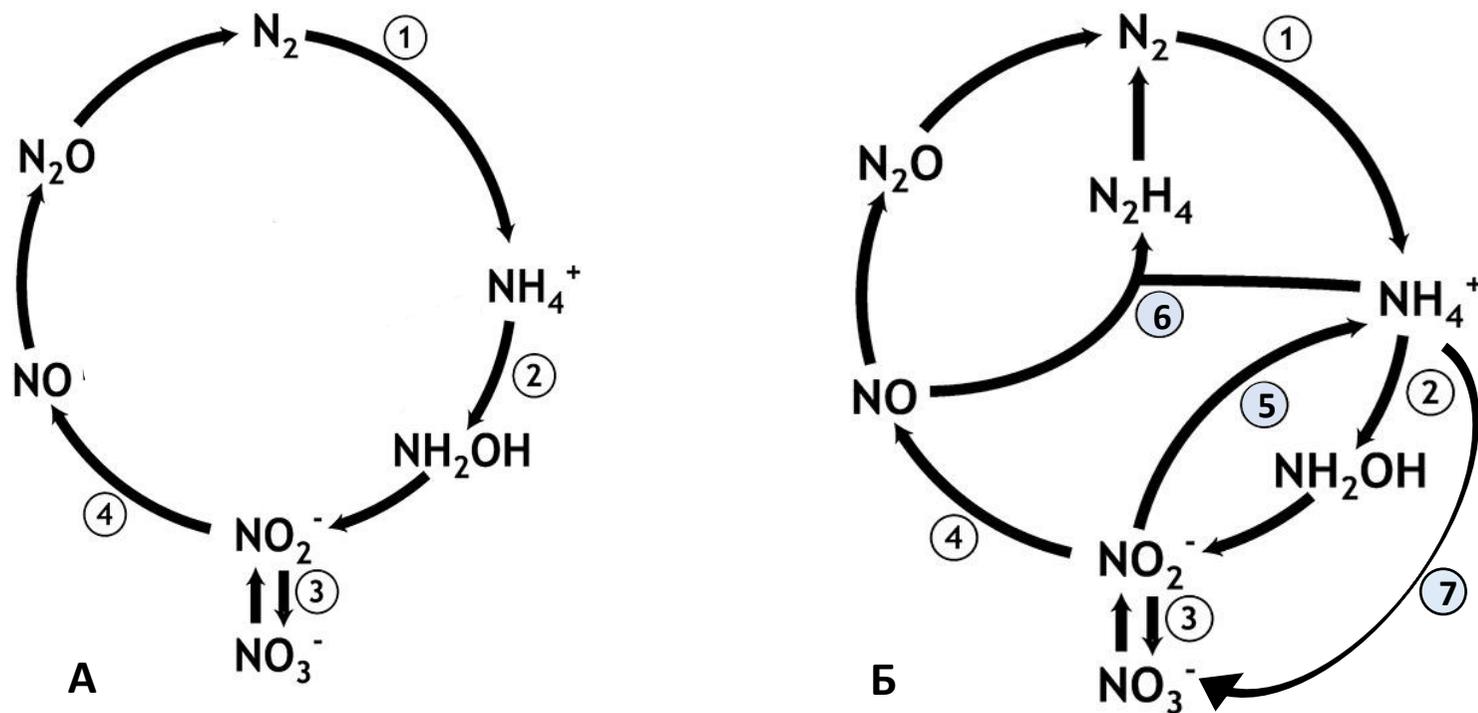


Рисунок 1. Биогеохимический цикл азота (по Jetten, 2008). (1), фиксация азота; (2, 3), аэробное окисление аммония и нитрита бактериями (и археями); (4), денитрификация; (5), диссимиляционное восстановление нитрата и нитрита до аммония (DNRA); (6), анаэробное окисление аммония; (7), полное окисление аммония одним организмом.

На протяжении практически целого столетия эти представления считались окончательными и неизменными. В то же время отмечались отдельные факты, расходящиеся с принятой схемой. Так, например, было выявлено образование аммония при восстановлении нитрата бактериями рода *Azotobacter*, а позднее было показано, что суспензии клеток *Clostridium perfringens* (ранее *Cl. welchii*) и *Escherichia coli* способны стехиометрически восстанавливать нитрат в аммоний (Woods, 1938). Для того же организма, *C. perfringens*, было показано, что добавление нитрата в культивационную среду с глюкозой увеличивает выход клеток и продукцию АТФ на 16-20%, то есть восстановление нитрата в аммоний является энергодающим, диссимиляционным процессом (Hasan & Hall, 1975). Накопленная информация привела к признанию и описанию более короткого (по сравнению с денитрификацией) пути в восстановительной ветви цикла азота (Рисунок 1Б, (5)) - диссимиляционного (респираторного) восстановления нитрита в аммоний (Cole & Brown, 1980). Открытия, значительно изменившие классические представления об основных этапах микробного цикла азота, были сделаны за последние 30 лет. Прежде всего, это обнаружение в 90-е годы XX века нового пути денитрификации - анаэробного окисления аммония (анаммокс) (Рисунок 1Б, (6)). Возможность такого процесса была ранее предсказана на основании термодинамических расчетов (Broda, 1977). Почти десять лет ушло на верификацию этого процесса, доказательство биологической природы и, наконец, выделения микроорганизма, осуществляющего его (Van de Graaf et al., 1990; 1995; 1996; Strous et al., 1999). В настоящее время морфология и физиология анаммокс-бактерий достаточно хорошо изучена. Они представляют собой мезофильных облигатно-анаэробных литоавтотрофных бактерий, обитающих не только в системах очистки сточных вод, но и в природных пресноводных и морских экосистемах (Op den Camp, 2006; van Niftrik, 2013). Филогенетически они относятся к филуму *Planctomycetes*, но образуют в нем отдельный кластер, и сходство с другими планктомицетами составляет всего 74-77% (Strous et al., 1999).

На сегодняшний день не выделено ни одной чистой культуры анаммокс-планктомицетов, все имеющиеся в лабораториях культуры имеют статус *Candidatus*.

Два других открытия связаны с процессом нитрификации – аэробного окисления аммония в нитрат. Со времен работ Виноградского было известно, что этот процесс осуществляется последовательно двумя группами бактерий, аммоний-окисляющими и нитрит-окисляющими. Спустя более 100 лет, в 2005 году было впервые показано, что первую стадию нитрификации могут осуществлять не только бактерии, но и археи, и получена культура '*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*' (Könneke et al., 2005). Примечательно, что данная мезофильная архея (рост при 28°C) филогенетически принадлежит филуму *Crenarchaeota*, все культивируемые представители которого являются гипертермофилами. Удалось также получить и первую чистую культуру аммоний-окисляющей археи, *Nitrososphaera viennensis*, что позволило валидно описать новый класс *Nitrososphaeria* (Stieglmeier et al., 2014). Был описан новый филум *Thaumarchaeota*, объединяющий мезофильные аммоний-окисляющие археи из различных местообитаний, и *N. viennensis* стала его первым валидированным представителем.

В 2015 году появились публикации об обнаружении способности окисления аммония до нитрата одним организмом, разрушившие более чем вековые представления о двухстадийности процесса нитрификации (Рисунок 1Б, (7)). Умеренно-термофильная аэробная бактерии '*Candidatus Nitrospira inopinata*' росла на среде с аммонием в качестве единственного источника энергии и CO₂ в качестве источника углерода с образованием нитрата в стехиометрическом соотношении (Damis et al., 2015). Данные полногеномного секвенирования этой бактерии выявили полные наборы генов, кодирующих белки, необходимые для окисления как аммония, так и нитрита. Одновременно такие же данные были получены для двух других мезофильных бактерий, '*Candidatus Nitrospira nitrosa*' и '*Candidatus Nitrospira nitrificans*' (van Kessel et al., 2015).

Открытия последних десятилетий показали, что микроорганизмы, участвующие в преобразованиях соединений азота, все еще содержат множество нераскрытых тайн и сюрпризов, требующих выявления для полного понимания биогеохимического цикла азота и вызывают возрождение интереса к этому полю исследований.

В последние десятилетия значительно увеличилось антропогенное воздействие на глобальный круговорот азота. Интенсивное использование азотных удобрений в сельском хозяйстве может вызывать изменения в удаленных наземных и морских экосистемах (Brooks, 2003; Duce et al., 2008). Хорошо растворимые ионы нитрата и нитрита легко вымываются из почвы и концентрируются в конечном итоге в океанах. Будучи токсичными, они представляют угрозу для морских биотопов. Нитраты и нитриты могут скапливаться в грунтовых водах, служащих важным источником питьевой воды, что создает серьезные угрозы для здоровья населения. Кроме того, удобрение почв может вызывать интенсивную денитрификацию, что приводит к накоплению оксидов азота в атмосфере и таким образом вносит вклад в глобальное изменение климата (Hanke & Strous, 2010). Для успешного противодействия негативным эффектам азотных загрязнений необходимо всестороннее изучение и понимание микроорганизмов, участвующих в трансформации азота. В термальных местообитаниях функционирование восстановительной части цикла азота обеспечивают нитратвосстанавливающие прокариоты.

2.1.2. Биоразнообразие термофильных нитратредукторов

2.1.2.1. Филогенетическое разнообразие

Информации о восстановлении нитрата археями мало. Очевидно, это связано с тем, что первые гипертермофилы были открыты в начале 80х годов, когда появилась революционная концепция трех доменов жизни (Woese & Fox, 1977), и выяснилось, что первый известный гипертермофильный организм, *Sulfolobus acidocaldarius*, принадлежит к новообразованному домену *Archaea* (Zillig et al., 1979). Поскольку гипертермофилы

занимали наиболее глубокие ветви на филогенетических деревьях, именно они считались первыми живыми организмами на Земле (Stetter, 2006). В изучении метаболизма наибольший интерес вызывали способность к автотрофному росту и использование водорода, восстановленных соединений серы и железа как наиболее вероятных доноров и акцепторов древнейшей биосферы Земли. Нитратредукция считалась более поздним процессом, и ей уделялось меньше внимания. У кренархеот способность к восстановлению нитрата проверяли у представителей родов *Caldisphaera*, *Fervidicoccus*, *Ignicoccus*, *Pyrobaculum*, *Pyrolobus*, *Stetteria*, *Stygiolobus*, *Thermoproteus*, *Vulcanisaeta*; у *Euryarchaeota* такую способность проверяли у представителей родов *Archaeoglobus*, *Ferroglobus*, *Geoglobus* и *Palaeococcus*. Было показано, что всего несколько архей, *Pyrolobus fumarii*, *Ferroglobus placidus* и три из восьми видов *Pyrobaculum* могут восстанавливать нитрат (Blöchl et al., 1997; Hafenbradl et al., 1996; Völkl et al., 1993; Amo et al., 2002), из чего следует, что по сравнению с восстановлением железа и серы, нитратредукция, видимо, менее распространена среди гипертермофильных архей (Таблица 3).

Информации о восстановлении нитрата термофильными бактериями больше, хотя эта способность также далеко не всегда проверяется, особенно у организмов-бродильщиков из филумов *Firmicutes* и *Thermotoga*. В настоящее время известно, что восстанавливать нитрат могут более 80 видов термофильных бактерий, представители филумов *Firmicutes*, *Aquificae*, *Proteobacteria*, *Deferribacter*, *Deinococcus-Thermus* и *Nitrospirae* (Таблица 3). Как правило, сульфатвосстанавливающие бактерии, относящиеся к филумам *Firmicutes*, *Nitrospirae*, *Proteobacteria* и *Thermodesulfobacteria*, не восстанавливают нитрат, хотя есть и исключения: *Ammonifex degensii*, *Thermodesulfobium narugense*, *Thermodesulfovibrio islandicus* (Huber et al., 1999; Mori et al., 2003; Sonne-Hansen & Ahring, 1999).

Филум *Firmicutes* - один из самых многочисленных бактериальных таксонов - включает в себя почти половину известных термофильных анаэробных бактерий. Представители класса *Bacillus*, включая виды родов *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Tepidibacillus*,

Vulcanibacillus осуществляют неполное восстановление нитрата в нитрит, а *Microaerobacter geothermalis* способен также к росту на нитрите с образованием газообразного азота (Khelifi et al., 2010). Виды рода *Geobacillus* различаются по способности и по конечному продукту восстановления, NO_2^- или N_2 (Nazina et al., 2001, 2004, Coorevits et al., 2012). Практически все нитратвосстанавливающие бациллы являются факультативными аэробами или микроаэрофилами и в анаэробных условиях используют нитрат вместо кислорода как конечный акцептор электронов. Исключение составляют строго-анаэробные *B. infernus* и *V. modesticaldus* (Boone et al., 1995; L'Haridon et al., 2006a). В классе *Clostridia* восстанавливают нитрат с образованием аммония все галофильные алкалитермофильные бактерии, входящие в порядок *Natranaerobiales* (Mesbach et al., 2007). Такой же способностью обладает галотолерантная (рост до 10% NaCl) *Garciella nitratreducens*, относящаяся к семейству *Eubacteriaceae* порядка *Clostridiales* (Miranda-Tello et al., 2003). Восстанавливают нитрат виды рода *Moorella*, за исключением *M. glycerini* и *M. mulderi* (Balk et al., 2008; Неромпнуашчауа et al., 2012). Помимо этого, лишь для нескольких организмов есть сведения о восстановлении нитрата. Кроме упоминавшихся выше *Ammonifex degensii* и *Thermodesulfobium narugense*, это *Caldinitratiruptor microaerophilus*, *Tepidimicrobium xylanilyticum* и *Thermovenabulum ferrioganovorum* (Zavarzina et al., 2002; Niu, et al., 2009; Fardeau et al., 2010). При этом другие виды родов *Tepidimicrobium* и *Thermovenabulum* не являются нитратредукторами.

Среди термофильных бактерий, относящихся к другим филумам, нитратредукция наиболее распространена у представителей *Aquificae*: из 20 анаэробных видов, 13 являются нитратредукторами. Все представители родов *Phorcysia* и *Thermovibrio* восстанавливают нитрат до аммония (Pérez-Rodríguez et al., 2012; Huber et al., 2002b), а члены родов *Aquifex*, *Hydrogenivirga* и *Persephonella* осуществляют денитрификацию (Huber et al., 1992; Nakagawa et al., 2004; Götz et al., 2002). *Desulfurobacterium crinifex* и *D. pacificum* восстанавливают нитрат, тогда как *D. thermolithotrophum* и *D. atlanticum* такой способностью не обладают (Alain

et al., 2003; L'Haridon et al., 2006b; L'Haridon et al., 1998). Из пяти известных видов *Sulfurihydrogenibium* только *S. subterraneum* способен использовать нитрат как акцептор электронов (Nakai et al., 2003; Gilberto et al., 2008).

В филуме *Proteobacteria* нитратредукторы сконцентрированы в классе *Epsilonproteobacteria*. Респираторную аммонификацию осуществляют все виды родов *Hydrogenimonas*, *Caminibacter* и *Cetia* (Takai et al., 2004; Alain et al., 2002; Groshe et al., 2015), а также *Nautilia nitratreducens* (Pérez-Rodríguez et al., 2010) и, как было показано в результате дополнительных исследований, *N. profundicola* (Hanson et al., 2013). До азота восстанавливает нитрат *Nitratiruptor tergarcus* (Nakagawa et al., 2005). Кроме *Epsilonproteobacteria*, восстанавливать нитрат способны '*Piezobacter thermophilus*', *Thiopfundum lithotrophica* и *Geothermobacter ehrlichii*, входящие в классы *Alpha*-, *Gamma*- и *Deltaproteobacteria* соответственно (Takai et al., 2009; Kashefi et al., 2003) и *Thermothrix thiopara* и *Tepidiphilus succinatimandens*, принадлежащие к классу *Betaproteobacteria* (Caldwell et al., 1976; Bonilla Salinas et al., 2004; Poddar et al., 2014).

Нитратвосстанавливающей способностью обладают все термофильные члены семейства *Deferribacteraceae* (филум *Deferribacteres*) – представители родов *Deferribacter* и *Calditerrivibrio* (Greene et al., 1997; Iino et al., 2008), а также все термофильные анаэробные представители филума *Deinococcus-Thermus*: *Oceanithermus profundus*, *O. desulfurans*, *Rhabdothermus arcticus* и *Vulcanithermus mediatlanticus* (Miroshnichenko et al., 2003a, b; Mori et al., 2004; Steinsbu et al., 2011).

Один вид рода *Thermodesulfovibrio* (филум *Nitrospirae*), *T. islandicus*, способен восстанавливать нитрат, причем этой способностью обладает только один из трех штаммов (Sekiguchi et al., 2008). Таким образом, восстановление нитрата не является ни родо-, ни видоспецифичным свойством.

2.1.2.2. Физиологическое разнообразие

За исключением представителей порядка *Natranaerobiales*, нитратвосстанавливающие прокариоты являются нейтрофилами. Примерно половина из них были выделены из морских или подземных экосистем и растут оптимально при умеренной солености (2-3% NaCl). Большая часть бактерий нитрат-редукторов имеют оптимальную температуру роста 55-60°C. При более высоких температурах растут представители филума *Aquificae* ($T_{\text{опт}}$ 63-85°C), при более низких – представители порядка *Natranaerobiales* ($T_{\text{опт}}$ 45-53°C).

Органотрофные и литотрофные бактерии среди нитратредукторов представлены в почти равной пропорции. Органотрофы принадлежат, в-основном, к филуму *Firmicutes* и используют в качестве источника углерода и энергии сложные белковые соединения - пептон, дрожжевой экстракт, триптон; углеводы - моно- и дисахариды и крахмал; органические кислоты - лактат, малат, пируват, фумарат, которые могут сбрасывать или использовать с внешним акцептором электронов. *Microaerobacter geothermalis*, *Vulcanithermus mediatlanticus* и *Thermovenabulum ferriorganovorum* могут также использовать водород для гетеролитотрофного роста в присутствии органического источника углерода (Khelifi et al., 2010; Miroshnichenko et al., 2003b; Zavarzina et al., 2002); *Ammonifex degensii* и *Thermodesulfobium narugense* могут расти с водородом автотрофно (Huber et al., 1996; Mori et al., 2003). Для нитратвосстанавливающих членов рода *Moorella* характерно гомоацетатное брожение, кроме того, *M. thermoautotrophica* образует ацетат при автотрофном росте с водородом и CO₂ (Wiegel et al., 1981), а *M. thermoacetica*, *M. perchloratireducens*, и *M. stamsii* являются гидрогеногенными карбоксидотрофами (Jiang et al., 2009; Balk et al., 2008; Alves et al., 2013).

Литотрофные термофильные нитратредукторы относятся к филумам *Aquificae*, *Proteobacteria* и *Deferribacteres*. Представители *Aquificae* и *Proteobacteria* являются облигатными автотрофами и восстанавливают нитрат с водородом или соединениями серы в качестве доноров электронов. К литотрофному росту с окислением водорода способны все

виды рода *Deferribacter*, однако, *D. thermophilus* и *D. desulfuricans* нуждаются для этого в органическом источнике углерода (Greene et al., 1997; Takai et al., 2003). *Caldithrix abyssi* также нуждается в дрожжевом экстракте для восстановления нитрата с водородом (Miroshnichenko et al., 2003c), а *Thermodesulfovibrio islandicus* растет литотрофно с водородом только в присутствии ацетата (Sonne-Hansen et al., 1999).

2.1.3. Основные метаболические пути и ферменты диссимиляционного восстановления нитрата

Процесс восстановления нитрата начинается всегда с образования нитрита. Нитрит в свою очередь может восстанавливаться либо по пути денитрификации с образованием газообразных продуктов, либо по пути диссимиляционного восстановления с образованием аммония (Рисунок 1, (4) и (5)).

Нитратредуктазы. Респираторные нитратредуктазные ферментативные комплексы относятся или к Nar или к Nar типу. Восстановление нитрата в нитрит катализируется цитоплазматическим мембрансвязанным комплексом NarGHI или периплазматической нитратредуктазой NarAB. Модельными организмами для изучения этих ферментов послужили *Proteobacteria*, белковые структуры с высоким разрешением получены для NarGHI комплекса *Escherichia coli*, NarAB комплекса *Rhodobacter sphaeroides* и NarA субъединицы *Desulfovibrio desulfuricans* (Simon & Klotz, 2013).

Комплекс NarGHI относится к семейству молибдоптериновоксидоредуктаз. Субъединица NarG прикреплена к мембране со стороны цитоплазмы и содержит активный сайт. Перенос электронов от мембранного хинонового пула на каталитическую единицу происходит через субъединицу NarI, представляющую собой трансмембранный дигемовый цитохром b, удерживающий фермент прикрепленным к мембране, и субъединицу NarH, содержащую 4 [Fe-S] кластера. Такое расположение фермента требует также наличия транспортеров для переноса нитрата в цитоплазму и нитрита из нее.

В периплазматической системе нитратредукции Nar типа, каталитической единицей является большая субъединица (NarA) NarAB комплекса. Так же как NarG, NarA содержит молибденовый кофактор и [4Fe-4S] центр. NarB субъединица представляет собой дигемовый цитохром с. Основной системой переноса электронов для редуктазы Nar типа считается мембран-связанный тетрагемовый цитохром с, NarC. Для протеобактерий, не имеющих гена *narC*, например, *Wolinella succinogenes*, была предложена другая система - NarGH комплекс, состоящий из двух Fe/S белков (Kern & Simon, 2009).

Ферменты денитрификации. Ферменты, участвующие в восстановлении нитрита до газообразных соединений азота, также изучали, главным образом, у мезофильных представителей филума *Proteobacteria* (Simon & Klotz, 2013).

Восстановление нитрита в NO в грамотрицательных бактериях катализируют два функционально схожих, но эволюционно-независимых периплазматических фермента: медьсодержащий белок NirK или NirS, представляющий собой цитохром cd_1 (Moura & Moura, 2001). В результате действия Nir ферментов образуется окись азота (NO) – радикал, неспецифически реагирующий с множеством различных молекул. Для предотвращения его накопления в клетке согласованно с нитритредуктазой действует мембрансвязанная NO-редуктаза (NOR) (Spiro, 2007; Zumft, 2005). Результатом действия этого фермента является образование закиси азота (N_2O). Редуктаза закиси азота, NOS, у грамотрицательных бактерий располагается в периплазме; у *B. azotoformans* она связана с мембраной. Фермент NosZ представляет собой гомодимер с двумя медьсодержащими центрами (Cu_A и Cu_Z) в каждом мономере. Отсутствием гена *nosZ* можно объяснить неполное восстановление нитрата или нитрита до закиси азота у некоторых денитрификаторов (Richardson et al., 2009).

Денитрификация у архей. О биохимических механизмах нитрат-редукции у архей известно гораздо меньше. Исследовались всего несколько генов и ферментов денитрификации у галофильных архей *Haloarcula marismortui* и *Haloferax mediterranei*, а также гипертермофила *Pyrobaculum aerophilum*. Архейные нитратредуктазы, как и

бактериальные, являются мембрансвязанными белками, и их последовательности имеют высокое сходство с редуктазами Nar типа, однако реакционный центр расположен не в цитоплазме, а на внешней стороне мембраны (Cabello et al., 2004; Afshar et al., 2001). Архейные нитратредуктазы получили название pNar (от 'periplasmic'). Кроме того, аналогов narI, не было обнаружено в геномах архей, видимо, из-за отсутствия необходимости переноса электронов через мембрану в цитоплазму. Каким образом происходит транспорт электронов от хинонового пула на активный центр фермента неясно; предлагаются гипотезы, различные для галофильных архей и *Pyrobaculum aerophilum* (Martinez-Espinosa et al., 2007; de Vries et al., 2010). Гены обоих типов нитритредуктаз, *nirK* и *nirS*, обнаружены у архей, причем у *P. aerophilum* этот белок является мембрансвязанным, а не периплазматическим, как у бактерий (Kraft et al., 2011). NO-редуктаза, обнаруженная у *P. aerophilum*, относится к белку qNor типа, а N₂O-редуктаза у него является мембрансвязанной, в отличие от бактериальных аналогов (de Vries & Schröder, 2002).

Диссимиляционное восстановление нитрата в аммоний. Наиболее изученной аммоний-образующей нитритредуктазой является пентагемовая цитохром с редуктаза, NrfA. Белок NrfA был выделен, очищен и охарактеризован, включая получение структур с высоким разрешением, у протеобактерий *Escherichia coli*, *Wolinella succinogenes*, *Desulfovibrio vulgaris* (Simon & Klotz, 2013). Этот фермент существует как периплазматический белок, например, у *Gamma*proteobacteria, или как субъединица мембрансвязанного комплекса, в который также входит тетрагемовый цитохром с, называемый NrfH. Такой NrfHA комплекс характерен для *Delta*- и *Epsilon*proteobacteria (Simon & Klotz, 2013). Помимо восстановления нитрита, NrfA может преобразовывать другие субстраты – окись азота, гидроксилламин, перекись водорода и сульфит, что указывает на детоксификационную роль этого белка в клетке (Poock et al., 2002; Kern et al., 2011).

Кроме NrfA восстанавливать нитрит в аммоний могут октагемовые нитритредуктазы (ONR), также являющиеся цитохромами с. Одна из них была выделена из сероокисляющей

бактерии *Thioalkalivibrio nitratireducens* (Tikhonova et al., 2006). Эти ферменты входят в имеющее широкое таксономическое распространение суперсемейство мультгемовых цитохромов с, куда также включены NrfA, гидросиламин оксидоредуктаза (Hao) и гидразиноксидоредуктаза (Hzo). Последние два фермента участвуют в аэробном окислении аммония в нитрит и в анаэробном его окислении (анаммокс). Большой интерес вызывает так называемый ϵ Hao, гены которого обнаружены у некоторых *Epsilonproteobacteria*, способных к респираторной аммонификации, несмотря на отсутствие генов *nrfA*, в частности у *Nautilia profundicola* (Kern & Simon, 2009; Campbell et al., 2009; Hanson et al., 2013).

Из рассмотрения множества биохимических путей превращений нитрата и их взаимодействия, очевидно, что цикл азота представляет собой скорее сложную сеть, чем полный круг (Рисунок 1Б). Эта сеть обеспечивает разнообразие экологических ниш для микроорганизмов. В окружающей среде различные физиологические группы конкурируют за нитрат. В зависимости от доминирующего пути нитратного дыхания, азот остается в биотопе или удаляется из него. Денитрификация и анаммокс ведут к высвобождению газообразных соединений азота в атмосферу. Респираторная аммонификация, наоборот, сохраняет азот доступным для последующих биологических процессов. Для полного понимания функционирования глобального цикла азота необходимо выделение и изучение микроорганизмов, осуществляющих каждую его стадию, условий, влияющих на их метаболические и физиологические свойства, и ферментов, катализирующих трансформацию соединений азота. Особенно это важно для термофильных прокариот, для которых информации значительно меньше, чем для мезофилов. Цикл азот также тесно связан с другими биогеохимическими циклами, в частности, с циклами углерода и серы.

2.2. Цикл серы и участие в нем микроорганизмов

Как и азот, сера является одним из элементов, играющих чрезвычайно важную роль в круговороте веществ биосферы и относится к числу химических элементов, необходимых

для живых организмов. Сера входит в состав некоторых аминокислот (цистеин, метионин), витаминов (биотин, тиамин), бактериохлорофилла, ферментов. Сера участвует в образовании третичной структуры белка (формирование дисульфидных мостиков).

В составе земной коры соединения серы существуют, в основном, в двух минеральных формах: сульфидной (соли сероводородной кислоты) и сульфатной (соли серной кислоты). Самородная сера встречается редко, главным образом, в зонах вулканической активности и гидротермах. Она химически неустойчива и склонна, в зависимости от значений окислительно-восстановительного потенциала среды, формировать или кислородные, или водородные соединения. Первичной, глубинной по происхождению, минеральной формой нахождения серы в земной коре, является сульфидная. Сульфидные соединения в условиях биосферы практически нерастворимы, и потому сульфидная сера растениями не усваивается. Но в то же время сульфиды в кислородной среде неустойчивы и окисляются, в результате чего сера переходит в состав сульфатных соединений. Сульфатные соли обладают достаточно хорошей растворимостью, и сера активно мигрирует в водных растворах в составе сульфат-иона SO_4^{2-} (Перфилова и Махлаев, 2009). В таком виде она поступает из почвы в растения и затем в другие живые организмы. После их гибели часть серы восстанавливается в почве микроорганизмами до H_2S , другая часть окисляется до сульфатов и вновь включается в круговорот. Образовавшийся сероводород улетучивается в атмосферу, там окисляется и возвращается в почву с осадками. Одним из важных природных соединений серы является сернистый газ – диоксид серы или сернистый ангидрид (SO_2). Он является типичным компонентом вулканических газов, где его доля составляет около 5%. Кроме того, SO_2 образуется в результате лесных пожаров, а также естественного разложения растительности. Сернистый газ легко растворим, и в водных системах присутствует, обычно, в виде сульфит-иона.

Человеческая деятельность вносит существенные изменения в круговорот серы. Увеличивается поток серы, поступающий в океаны, что вызвано обогащенными серой

сточными водами и сельскохозяйственными удобрениями, попадающими в реки. Сжигание человеком ископаемого топлива (особенно угля), а также выбросы химической промышленности, приводят к накоплению в атмосфере сернистого газа (SO_2), который реагируя с атмосферным кислородом и парами воды, выпадает на землю в виде кислотных дождей. Вокруг промышленных районов таким путем происходит сильное подкисление почвы вплоть до полной гибели растительности вблизи некоторых химических предприятий. Это одна из проблем охраны почв от техногенных загрязнений. (Бримблекумб и др., 1999; Речкин и Ладыгина, 2010).

Сера, как и азот, относится к элементам с переменной валентностью. В природе сера претерпевает разнообразные химические и биологические превращения, переходя из неорганических соединений в органические и обратно, меняя валентность в пределах от +6 до -2. Круговорот серы совершается в результате жизнедеятельности бактерий, окисляющих или восстанавливающих ее. Исследование трансформации серных соединений наряду с изучением цикла азота положило начало микробной экологии, у истоков которой стояли Бейеринк и Виноградский. Изучение серобактерий, *Beggiatoa*, окисляющих сероводород и накапливающих серу в клетке, а затем при недостатке H_2S , образующих сульфат, привело Виноградского к открытию хемосинтеза (Winogradsky, 1887; Dworkin, 2012). Бейеринк стал первооткрывателем сульфатредукции и выделил первого сульфатредуктора, *Desulfovibrio desulfuricans* (Beijerinck, 1895; Skerman et al., 1980), который до сих пор служит модельным организмом для изучения восстановления соединений серы. Полный цикл включает в себя окисление сульфида до сульфата и обратное восстановление сульфата в сульфид. Образующиеся промежуточные соединения (элементная сера, полисульфиды, тиосульфат, политионаты и сульфит) могут использоваться в микробном метаболизме и как доноры, и как акцепторы электронов (Рисунок 2).

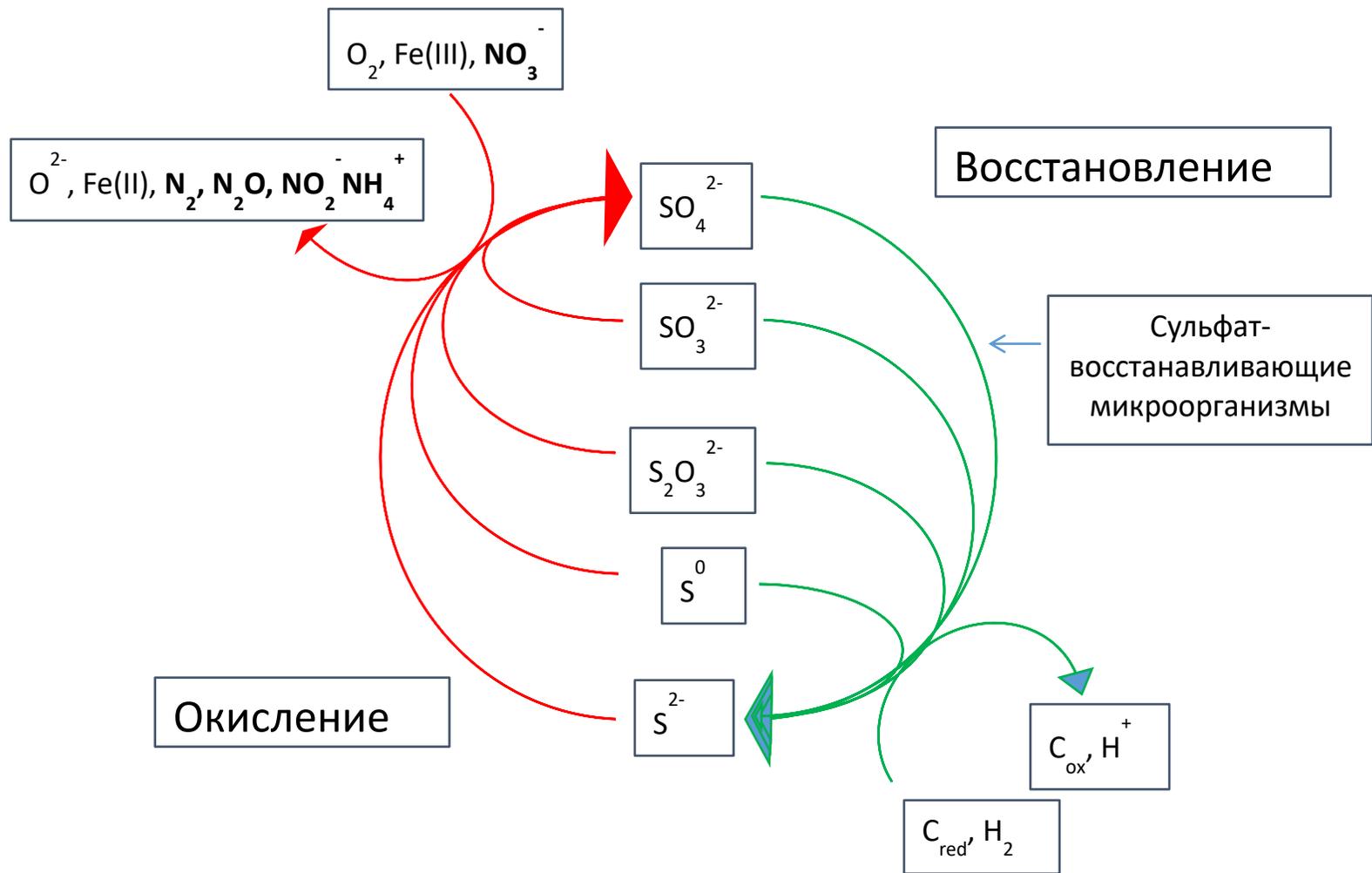


Рисунок 2. Биогеохимический цикл серы

2.2.1. Термофильные анаэробные микроорганизмы, участвующие в цикле серы

Восстановление сульфата и сульфита. Диссимиляционное восстановление сульфата (также называемое анаэробным сульфатным дыханием) - это ключевой этап глобального цикла серы, и он осуществляется только микроорганизмами. Сульфатвосстанавливающие прокариоты обнаружены практически во всех биотопах планеты и представляют физиологически весьма разнородную группу микроорганизмов (Muzyer & Stams, 2008; Rabus et al., 2015). Филогенетическое разнообразие микроорганизмов этой метаболической группы значительно уже (Таблица 1, 3). В отличие от нитрат- и, особенно, железоредукции сульфатредукция распределена среди довольно узкого круга прокариот.

Подавляющее большинство термофильных сульфатредукторов - это бактерии, половина из которых принадлежит филуму *Firmicutes* и представлена членами родов *Ammonifex*, *Brassicibacter*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Desulfurispora*, *Thermacetogenium* и *Thermodesulfobium*. Сульфатредукторами являются все виды родов *Thermodesulfobium* (филум *Nitrospirae*), *Thermodesulfatator* и *Thermodesulfobacterium* (филум *Thermodesulfobacteria*), *Desulfacinum*, *Desulfonauticus*, *Desulfosoma*, *Desulfothermus*, *Thermodesulforhabdus* и *Desulfomicrobium thermophilum* (класс *Deltaproteobacteria*), а также *Thermococoides shengliensis* (филум *Thermotoga*).

Информация о восстановлении сульфата археями ограничена лишь несколькими гипертермофилами (Таблица 1, 3). Автотрофная сульфатредукция с водородом в качестве донора электронов продемонстрирована только для представителей рода *Archaeoglobus* (Stetter, 1988b; Burggraf et al., 1990; Steinsbu et al., 2010). Есть также сведения о восстановлении сульфата при гетеротрофном росте с органическими субстратами *Palaeococcus pacificus*, *Caldivirga maquilangensis*, *Therrnocladiurn modestius* и *Thermoproteus thermophilus* (Zeng et al., 2013; Itoh et al., 1999; 1998; Yim et al., 2015), однако, эти сообщения не подкреплены экспериментальными доказательствами.

Промежуточным продуктом сульфатредукции является сульфит. Диссимиляционное восстановление сульфата в сульфид, проходит в две стадии, одна из которых, восстановление до сульфита – энергозатратный процесс, а дальнейшее восстановление протекает с высвобождением энергии. Поэтому практически все сульфатвосстанавливающие прокариоты могут также использовать и сульфит в качестве конечного акцептора электронов. Среди неспособных к сульфатредукции микроорганизмов ряд бактерий и архей может расти за счет восстановления сульфита. К ним относятся представители мезофильных родов протеобактерий - *Campylobacter*, *Sulfurospirillum*, *Wolinella*, *Shewanella* (Schumacher et al., 1992; Kern et al., 2011; Shirodkar et al., 2011) и *Firmicutes* - *Desulfitibacter*, *Desulfitispora* и *Desulfitobacterium* (Nielsen et al., 2006; Sorokin & Muyzer, 2010; Utkin et al., 1994). Большинство сульфитвосстанавливающих прокариот используют органические вещества для восстановления SO_3^{2-} и неспособны к автолитотрофному росту. Среди термофилов такой способностью обладают бактерии *Calderihabitans maritimus* и *Sulfurihydrogenibium azorense* (Yoneda et al., 2013; Aguiar et al., 2004), а также археи *Archaeoglobus veneficus* и *Pyrobaculum islandicum* (Huber et al., 1997; Huber et al., 1987), использующие водород или CO для диссимиляционного восстановления сульфита.

Восстановление серы. Восстановление элементной серы широко распространено среди гипертермофильных членов домена *Archaea*. За несколькими исключениями, включающими *Ignisphaera aggregans*, *Pyrolobus fumari*, *Sulfophobococcus zilligii* и *Thermosphaera aggregans* (Niederberger et al., 2006; Blöchl et al., 1999; Hensel et al., 1997; Huber et al., 1998), рост которых она ингибирует, все анаэробные *Crenarchaeota* могут восстанавливать серу. В филуме *Euryarchaeota* сероредукция показана для родов *Palaeococcus*, *Pyrococcus*, *Thermococcus* и некоторых метаногенов (Таблица 3).

Известно несколько способов восстановления серы археями (Liu et al., 2012a; Offre et al., 2013; Barton et al., 2014).

(а) Факультативно или облигатно хемолитоавтотрофно с водородом в качестве донора электронов восстанавливают серу кренархеоты родов *Acidianus*, *Stygiolobus*, *Sulfurisphaera*, *Ignicoccus*, *Pyrodictium*, *Pyrobaculum* и *Thermoproteus* и некоторые эуриархеоты рода *Thermoplasma*.

(б) Многие археи, включая представителей родов *Acidilobus*, *Caldisphaera*, *Desulfurococcus*, *Fervidicoccus*, *Hyperthermus*, *Stetteria*, *Thermofilum*, *Pyrodictium*, *Thermodiscus*, *Thermogladius*, *Palaeococcus*, *Pyrococcus* и *Thermococcus*, используют серу для сбрасывания окислительно-восстановительных эквивалентов, освобождающихся при сбраживании органических субстратов («облегченное брожение» с экзогенным акцептором электронов). Сера также может использоваться для связывания молекулярного водорода, выделяющегося при брожении, и таким образом выполнять функцию снятия его ингибирующего действия.

(в) Некоторые виды родов *Pyrobaculum*, *Vulcanisaeta*, *Thermocladium*, *Thermoproteus*, *Caldivirga*, принадлежащих к порядку *Thermoproteales*, осуществляют диссимиляционный процесс серного дыхания с органическими донорами электронов.

(г) Некоторые метаногены, например, представители родов *Methanopyrus* и *Methanobacterium*, образуют значительные количества H_2S при росте с элементной серой, однако этот процесс не связан с получением и запасанием энергии.

Восстанавливать элементную серу могут не только гипертермофильные археи, эта способность характерна и для гипертермофильных бактерий (Таблица 3). Восстанавливают серу практически все представители филума *Thermotoga* (Reysenbach, 2001). Сероредукторами являются все анаэробные члены филума *Aquificae*, за исключением *Desulfurobacterium atlanticum* (L'Haridon et al., 2006b), а также микроаэрофильные *Persephonella marina* и *Sulfurihydrogenibium azorense* (Götz et al., 2002; Aguiar et al., 2004). Представители *Aquificae* осуществляют респираторный путь хемолитоавтотрофного окисления водорода с серой в качестве конечного акцептора электронов, тогда как

Thermotoga восстанавливают серу в ходе «облегченного сбразивания» белковых и/или углеводных субстратов. Использовать серу в качестве акцептора могут представители многих родов филума *Firmicutes*, включая *Ammonifex*, *Anaerobranca*, *Anoxybacter*, *Brockia*, *Caldanaerobacter*, *Caldanaerovirga*, *Caloramator*, *Carboxydotherrmus*, *Fervidicola*, *Sporanaerobacter*, *Tepidibacter*, *Tepidimicrobium*, *Thermoanaerobacter*, *Thermobrachium*, *Thermosediminibacter*, *Thermotalea*, *Thermovenabulum* и *Thermovirga*. Среди протеобактерий восстанавливать серу способны члены классов *Delta*- и *Epsilonproteobacteria*, такие как *Desulfonauticus*, *Desulfurella* и *Hippea*, *Hydrogenimonas*, *Caminibacter*, *Cetia*, *Lebetimonas*, *Nautilia*. Кроме того, сероредукторами являются некоторые виды родов *Deferribacter*, *Oceanithermus*, *Rhabdotherrmus*, *Anaerobaculum* и *Thermanaerovibrio*, относящиеся к филумам *Deferribacteres*, *Deinococcus-Therrmus* и *Synergistetes*. Серовосстанавливающие бактерии растут за счет диссимиляционного восстановления серы в сульфид, которое может быть облигатным (анаэробное дыхание) или факультативным (брожение с экзогенным акцептором электронов). Представители *Deferribacteres* и *Proteobacteria* могут использовать водород для восстановления серы, но подавляющее большинство бактериальных сероредукторов – органотрофы, осуществляющие как полное, так и неполное окисление органических доноров электронов (Barton et al., 2014).

Окисление серы и ее соединений. Микробное окисление восстановленных неорганических соединений серы в сульфат составляет окислительную ветвь биогеохимического цикла серы (Рисунок 2). Сероокисляющие прокариоты фенотипически и таксономически разнообразны. К ним относятся хемолитотрофные археи, а также бактерии с различными типами метаболизма - фотолитотрофным, фотогетеротрофным, хемолитотрофным, хемогетеротрофным и метилотрофным. Сероокисляющие микроорганизмы были выделены из разнообразных местообитаний, включая такие экстремальные, как кислотные воды шахт, соленые и щелочные озера, сольфатары и горячие источники, морские гидротермы (Gosh & Dam, 2009). В окислении серы принимают участие

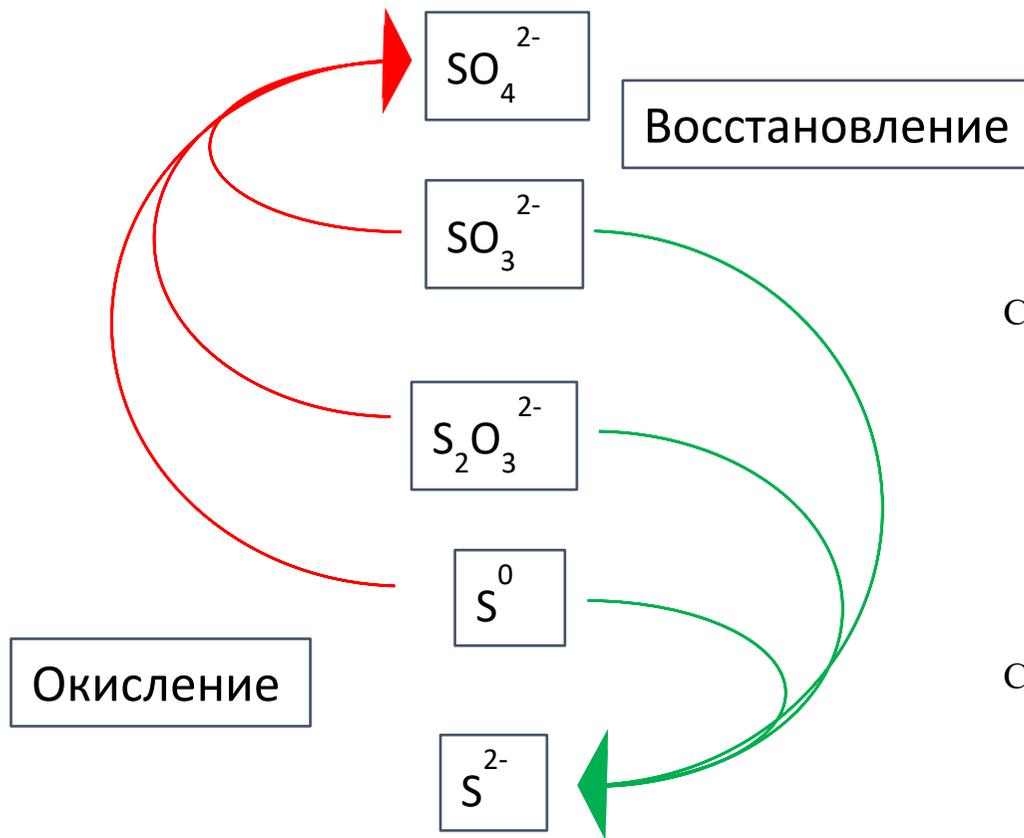
и фототрофы, и хемотрофы. Среди аноксигенных фотолитотрофных бактерий выделяют две группы, все члены которых используют соединения серы как донор электронов: зеленые серные бактерии, образующие филум *Chlorobi*, и пурпурные серные бактерии, входящие в семейства *Chromatiaceae* и *Ectothiorhodospiraceae*, класса *Gamma*proteobacteria. Кроме того, многие пурпурные несерные бактерии, относящиеся к *Alpha*-и *Beta*proteobacteria, некоторые нитчатые зеленые несерные бактерии и отдельные представители строго анаэробных грамположительных *Heliobacteria* способны окислять сероводород и серу при фототрофном росте (Frigaard & Dahl, 2009). Хемолитотрофные бактерии, способные окислять серу, известны среди представителей филумов *Proteobacteria* и *Aquificae*.

Большая часть сероокисляющих прокариот – мезофилы; термофильные и гипертермофильные виды принадлежат бактериям порядка *Aquificales* (Reysenbach, 2002) и кренархеотам родов *Acidianus* и *Sulfolobus* порядка *Sulfolobales* (Stetter, 1989). Показана также способность *Pyrobaculum aerophilum* окислять тиосульфат с нитратом или микроаэробно (Volkl et al., 1993). Строго анаэробный *Ferroglobus placidus*, относящийся к *Euryarchaeota*, для окисления сульфида использует нитрат как акцептор электронов (Hafenbradl et al., 1996). Кроме того, известны ‘*Piezobacter thermophilus*’, *Thermothrix thioparus* и *Thiopfundum lithotrophicum*, принадлежащие к *Alpha*-, *Beta*- и *Gamma*proteobacteria соответственно (Takai et al., 2009; Caldwell et al., 1976). Виды *Acidianus* - факультативные аэробы и могут расти не только за счет окисления H_2S или S^0 в H_2SO_4 в присутствии кислорода, но и восстанавливать серу с водородом в анаэробных условиях. В качестве акцептора при анаэробном окислении серы они используют Fe(III). *Sulfolobus* spp., напротив, облигатные аэробы, окисляющие H_2S , S^0 или тетрагидрат (Huber & Stetter, 2001). Термофильные сероокисляющие бактерии также являются факультативными или облигатными аэробами или микроаэрофилами, использующими кислород и/или нитрат в качестве акцептора электронов. Метаболическим разнообразием отличается порядок *Aquificales*. *Persephonella marina* и *Sulfurihydrogenibium azorense* могут не только окислять серные соединения, но и восстанавливать серу с водородом (Götz et al., 2002, Aguiar et al.,

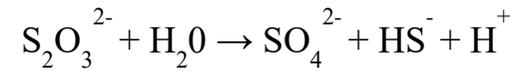
2004). *Sulfurihydrogenibium azorense* и *S. subterraneum* могут окислять серу и тиосульфат, при этом для окисления в анаэробных условиях они используют различные акцепторы, включая железо, селенат и арсенат. *S. azorense* не использует нитрат как акцептор для окисления серы (Aguilar et al., 2004; Takai et al., 2003a).

Диспропорционирование соединений серы. Вследствие того, что сера - элемент с переменной валентностью, в процессе ее окисления-восстановления образуются несколько промежуточных соединений. Это создает возможность для диспропорционирования (дисмутации) соединений серы. Диспропорционирование (дисмутация) – окислительно-восстановительная реакция, в которой вещество с промежуточной степенью окисления одновременно восстанавливается и окисляется с образованием двух разных продуктов (Рисунок 3). Соединения серы здесь являются и донорами и акцепторами электронов, поэтому такой процесс называют также неорганическим брожением. Подвергаться диспропорционированию могут сульфит, тиосульфат и элементная сера, при этом образуются сульфат и сульфид.

Процесс микробного дисмутирования тиосульфата и сульфита был впервые показан в 1987 году (Bak & Cypionka 1987; Bak & Pfennig, 1987). Первая бактерия, способная осуществлять эти процессы, принадлежала к роду *Desulfovibrio* и была названа *D. disulfodismutans*. Затем было показано, что диспропорционирование сульфита и тиосульфата не ограничивается одним родом, а распространено среди сульфатредукторов, хотя не всегда этот метаболизм сопровождается ростом (Krämer & Cypionka, 1989). Несколько лет спустя было показано, что и элементная сера может метаболизироваться подобным образом (Thamdrup et al., 1993). Однако, в отличие от дисмутирования сульфита и тиосульфата, диспропорционирование серы в стандартных условиях - эндергонический процесс (Рисунок 3). Для того, чтобы он был термодинамически выгодным, необходимо удаление образующегося сульфида, что может быть достигнуто, в частности, добавлением в среду ионов Fe(III).

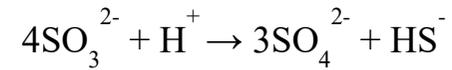


Суммарная реакция диспропорционирования тиосульфата:



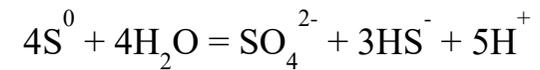
$$\Delta G^{\circ\prime} = -21,9 \text{ кДж/моль } \text{S}_2\text{O}_3^{2-}$$

Суммарная реакция диспропорционирования сульфита:



$$\Delta G^{\circ\prime} = -58,9 \text{ кДж/ моль } \text{SO}_3^{2-}$$

Суммарная реакция диспропорционирования элементарной серы:



$$\Delta G^{\circ\prime} = +10,3 \text{ кДж/моль } \text{S}^0$$

Рисунок 3. Диспропорционирование соединений серы

Среди термофилов впервые была показана способность *Desulfotomaculum thermobenzoicum* дисмутировать тиосульфат (Jackson & McInerney, 2000). Диспропорционирование элементной серы термофильными микроорганизмами было впервые показано совсем недавно и выделен первый термофильный диспропорционатор, *Thermosulfurimonas dismutans* (Slobodkin et al., 2012). В настоящее время есть информация о неорганическом сбраживании соединений серы для 25 мезофильных видов родов *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfocapsa*, *Desulfonatronum*, *Desulfonatronospira* и *Desulfonatronovibrio*, входящих в класс *Deltaproteobacteria* (Finster, 2008; Poser et al., 2013). Способность диспропорционировать элементную серу и ее соединения продемонстрирована всего для 4 видов термофильных бактерий, принадлежащих филуму *Thermodesulfobacteria* и классу *Deltaproteobacteria* (Slobodkin et al., 2012; 2013; 2016; Jackson & McInerney, 2000). Литоавтотрофные микроорганизмы, осуществляющие этот процесс, предъявляют минимальные требования к химическому составу биотопа и представляют экосистемы, которые могут быть основаны на метаболизме всего двух простых неорганических веществ, серы и CO₂.

2.2.2. Основные ферментативные пути микробной трансформации соединений серы

Восстановление сульфата и сульфита. Сульфатредукторы являются наиболее интенсивно изучаемой физиологической группой микроорганизмов. Исследуются филогенетическое разнообразие и связанные с ним вопросы эволюции, местообитания и экологическая роль, метаболизм и физиология, биохимические, геномные и транскриптомные данные, а также биотехнологическая значимость этих прокариот (Barton et al., 2014; Müller et al., 2015; Rabus et al., 2015). Неудивительно, что биохимический путь, механизмы и ферменты восстановления сульфата изучены наиболее детально. Модельными организмами служили, как правило, бактерии рода *Desulfovibrio*, которые являются наиболее быстро и легко растущими сульфатредуцирующими бактериями. Было выяснено, что

диссимиляционная сульфатредукция протекает в цитоплазме и начинается с энергозатратного активирования сульфата молекулой АТФ с образованием аденозин-5'-фосфосульфата (APS), этап, катализируемый сульфат аденилил трансферазой (Sat), называемой также АТФ сульфурилазой. APS восстанавливается в сульфит при помощи редуктазы AprVA. Сульфит далее восстанавливается в сульфид сульфитредуктазой DsrAB при участии небольшого белка DsrC. (Peck, 1959; Kremer et al., 1988; Grein et al., 2013; Santos et al., 2015). Ферменты, катализирующих ключевые этапы восстановления сульфата, включая АТФ сульфурилазы, APS-редуктазы AprVA и сульфитредуктазы DsrAB, были выделены из ряда бактерий и архей (Grein et al., 2013; Barton et al., 2014).

Энергетический метаболизм восстановления сульфата до конца не выяснен. Наиболее вероятным считается, что основную роль в нем играют мембрансвязанные респираторные комплексы QmoABC и DsrMKJOP строго консервативные у всех сульфатредукторов, и являющиеся физиологическими партнерами редуктаз AprVA и DsrAB соответственно. Опыты со штаммами-мутантами *Desulfovibrio vulgaris*, имеющими делеции генов *qmoABC*, подтвердили, что этот белковый комплекс необходим для восстановления сульфата, но не влияет на восстановление сульфита (Zane et al., 2010). У некоторых организмов были обнаружены только гены *dsrMK*, -белка который предположительно является минимальной функциональной единицей белкового комплекса, необходимого для восстановления сульфита (Pereira et al., 2011; Grein et al., 2013; Rabus et al., 2015).

Значительно меньше изучены механизмы восстановления сульфита у неспособных к сульфатредукции прокариот. У сульфитредуцирующей гипертермофильной археи *Archaeoglobus veneficus*, единственного представителя рода, не восстанавливающего сульфат, в геноме есть все гены сульфатредукции. Предполагается, что в ходе эволюции сохранилась функциональность Dsr белков, а необходимые для восстановления сульфата механизмы были утрачены (Simon & Krapcho, 2013). Многие бактерии могут, кроме сульфита, восстанавливать ряд других акцепторов электронов, включая нитрит, нитрат, тиосульфат и

др. Высказывалось предположение, что эти бактерии используют для сульфитредукции периплазматические мультигемные цитохромы *c*, в отличие от сульфатредукторов, использующих цитоплазматические DsrAB белки (Simon & Kroneck, 2013). Описано также восстановление сульфита у *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium с помощью цитоплазматического белка AsrABC (Huang & Barrett, 1990). Физиологическая роль и предполагаемый механизм взаимодействия с сульфитом у этого белка неизвестны.

Восстановление элементарной серы. Элементарная сера имеет свойство образовывать цепочки или кольца разной длины. Наиболее стабильной при нормальных внешних условиях является орторомбическое кольцо (α -S₈) (Roy & Trudinger, 1970). Из таких колец и следовых количеств S₇ колец, придающих ей желтый цвет, состоит коммерчески продаваемая элементарная сера (Steudel & Holz, 1988). Полимерная сера состоит, главным образом, из цепочек макромолекул. Сера достаточно реакционноспособна, и в отличие от сульфата для ее восстановления не требуется энергозатратной активации. Основная проблема использования клетками серы в ее низкой растворимости в воде: $1.9(\pm 0.6) \times 10^{-8}$ моль S₈·кг⁻¹ при 25°C (Bouleègue, 1978) или 5 мкг л⁻¹ (Hedderich et al., 1999). О механизмах взаимодействия клеток с серой практически неизвестно, вероятно, используются те же стратегии, что и для других нерастворимых акцепторов, в частности железа. Они включают прямой физический контакт клеток с серой и перенос электронов посредством белков, расположенных на внешней поверхности клеток, или не прямое восстановление с использованием переносчиков электронов или секрецией редокс-активных веществ. С другой стороны, известно, что сера легко превращается в полисульфиды в водных растворах сульфида; оксисоединения, такие как полиитионаты также растворимы в воде (Giggenbach, 1972). Абиотическое образование сульфида в неинокулированной среде, содержащей элементарную серу, наблюдалось при температурах выше 80°C. При рН выше 7.5 среда приобретала желто-оранжевый цвет. Эти наблюдения авторы объясняли возможным диспропорционированием серы и реакцией образованного сульфида с серой с образованием

полисульфидов, придававших среде соответствующую окраску (Belkin et al., 1985). Вероятно, сероредукторы используют доступную «гидрофильную» серу, которая состоит из элементной серы и небольшого количества растворимых соединений, таких как полисульфиды и/или политионаты.

Серовосстанавливающие прокариоты филогенетически весьма разнообразны, и это отражается в отсутствии универсального биохимического механизма восстановления серы. По сравнению с сульфатредукцией, механизмы восстановления серы изучались значительно менее интенсивно. У бактерий наиболее исследован механизм полисульфидного дыхания *Wolinella succinogenes* (Fauque et al., 1994; Hedderich et al., 1999). Выделенная периплазматическая полисульфидредуктаза PsrABC состоит из трех субъединиц: молибденсодержащей птериновой каталитической единицы PsrA, железосерного белка PsrB и интегрального белка PsrC, прикрепляющего другие субъединицы к мембране. Перенос электронов осуществляется от гидрогеназы или форматдегидрогеназы через менахинон. Показано, что серовосстанавливающей активностью у некоторых видов родов *Desulfomicrobium* и *Desulfovibrio* обладает тетрагемовый цитохром c_3 , а у *Desulfuromonas acetoxidans* тригемовый цитохром c_7 . В обоих случаях субстратами для фермента служат, видимо, полисульфиды, образующиеся в результате разрыва S_8 колец сульфидом.

Среди термофильных микроорганизмов изучение механизмов восстановления серы проводили у нескольких гипертермофильных архей родов *Acidianus*, *Pyrococcus* и *Pyrodictium*. Механизм и ферментная система восстановления серы водородом у *Crenarchaeota* *Acidianus ambivalens*, *Pyrodictium brockii* и у бактерии *W. succinogenes*, в целом, аналогичны и включают два мультиединичных мембрансвязанных фермента, гидрогеназу и сероредуктазу. *Pyrodictium abyssi* отличается наличием цитохромов b и c типа в ферментном комплексе (Keller & Dirmeier, 2001). *Pyrococcus furiosus* представляет модель для изучения облегченного брожения с серой. Было показано, что основными ферментами являются мембрансвязанный оксидоредуктазный комплекс MBX и цитоплазматическая

коферментА-зависимая НАДФ сероредуктаза NSR. У других организмов такая система пока описана не была (Bridger et al., 2011).

Окисление соединений серы. Метаболические пути окисления сульфида, элементарной серы и тиосульфата интенсивно исследовались у анаэробных фототрофных серных бактерий (*Chlorobium* и *Allochromatium*), факультативно хемолитоавтотрофных протеобактерий (*Acidithiobacillus* и *Paracoccus*) и у гипертермофильных кренархеот порядка *Sulfolobales* (Frigaard & Dahl, 2009; Friedrich et al., 2005; Kletzin et al., 2004). Тем не менее, эти пути и ферменты, катализирующие их, и участвующие в энергетическом метаболизме окончательно не выяснены.

Окисление сульфида. Несколько разных ферментов рассматриваются в качестве кандидатов для окисления сульфида: сульфид:хинон оксидоредуктаза (SQR), флавоцитохром с сульфид дегидрогеназа (FccAB) и Sox система (Schütz et al., 1997; Meyer & Cusanovich, 2003; Arria-Ayme et al., 2001). SQR обнаружена и у фототрофных, и у хемотрофных бактерий. SQR *Rhodobacter capsulatus* - мембрансвязанный флавопротеин с активным центром в периплазме. FccAB, видимо, не так широко распространен. Обычно это периплазматический фермент, в состав которого входят цитохром с и флавопротеин. Флавоцитохром с катализирует перенос электрона с сульфида на небольшие цитохромы с-типа *in vitro*, однако его роль *in vivo* неясна, поскольку он обнаружен не у всех сероокисляющих бактерий, и опыты с мутантными штаммами не выявили разницы в скоростях окисления серы (Frigaard & Dahl, 2009). Первичным продуктом окисления сульфида являются полисульфиды. Каким образом они преобразуются в серные глобулы, откладываемые серными бактериями внутри или снаружи клетки, неизвестно (Frigaard & Dahl, 2009; Barton et al., 2014).

Окисление элементарной серы. Многие прокариоты могут окислять элементарную серу из внешней среды, сталкиваясь при этом с теми же проблемами, что и сероредукторы. Кроме того, сера образуется в ходе окисления сульфида и откладывается либо в периплазматическом пространстве, либо снаружи клетки. Окисление отложений серы –

наименее понятный этап серного метаболизма. О способах проникновения элементарной серы в клетку или о ее трансформировании для этих целей практически неизвестно, и ферменты, катализирующие эти процессы, не выявлены. Некоторые серо-окисляющие бактерии, например, *Acidithiobacillus* spp., прикрепляются к сере с помощью внеклеточных полимеров, в частности, липополисахаридов. Было также показано, что при росте с серой поверхность клетки *Atb. ferrooxidans* становилась более гидрофобной, и удерживание гидрофобной серы обеспечивалось силами Ван дер Ваальса (Gehrke et al., 1998). Для утилизации нерастворимой серы необходимо ее активирование. Это может быть разрыв S₈ кольца нуклеофильным реагентом с образованием линейных полисульфидов или, возможно, восстановление серы в сульфиды. Обе реакции могут осуществляться при участии тиоловых групп цистеинов. Предполагается, что у *Acidithiobacillus* и *Acidiphilium* внешеклеточная сера мобилизуется тиоловыми группами особого белка внешней мембраны и транспортируется в периплазму как персульфид (Rohwerder & Sand, 2003). Было также показано, что серные цепочки предпочтительнее для микробной трансформации, чем более стабильные серные кольца (Franz et al., 2007).

Наиболее изученным в настоящее время способом окисления серы в цитоплазме является так называемый Dsr путь, включающий фермент обратную диссимиляционную сульфитредуктазу DsrAB. Модельным организмом для изучения биохимических механизмов окисления серных соединений послужил *Allochromatium vinosum* (Dahl et al., 2005). Единственным обнаруженным генным кластером, необходимым для окисления запасенной серы оказался *dsr* оперон. У модельного организма он состоит из 15 генов *dsrABEFHCKMLJOPNRS*. Большинство *dsr* генов широко распространены и встречаются у фототрофных и хемотрофных сероокисляющих бактерий, а также и у сульфатовосстанавливающих бактерий, где соответствующие белки катализируют восстановление сульфата в сульфид. Гены *dsrABCNMKJOP* представляют ядро оперона, встречающееся и у сероокисляющих, и у сульфатовосстанавливающих организмов, тогда как

dsrD был обнаружен только у сульфатредукторов, а *dsrEFH* типичен для окисляющих серу организмов (Sander et al., 2006). Поскольку белки, кодируемые *dsr* локусом, являются или цитоплазматическими, или мембрансвязанными, они не могут прямо воздействовать на экстрацитоплазматические глобулы серы. Предполагается, что сера из глобул активируется восстановлением в сульфаны или полисульфиды, и в таком виде транспортируется для дальнейшего окисления в цитоплазме обратной сульфитредуктазой. В качестве переносчиков серы из периплазматических или внеклеточных отложений в цитоплазму рассматриваются органические персульфиды, такие как глутатион амид персульфид, хотя как они образуются, точно неизвестно. Обширная сеть для переноса серы, включает роданазу, а также белки TusA, DsrE2, и DsrEFH, которые затем доставляют серу к белку DsrC, который, по-видимому, служащему прямым субстратом для DsrAB (Stockdreher et al., 2012; Dahl, 2015).

Окисление сульфита в сульфат. Заключительный этап окисления серных соединений может проходить двумя различными способами. Это может быть не прямое АМФ-зависимое окисление через APS, при котором сульфит окисляется в цитоплазме с участием Sat-AprBA-QmoABC ферментного комплекса, сходного с сульфатвосстанавливающим комплексом, но катализирующим обратную реакцию. (Frigaard1 & Dahl, 2008). Окисление сульфита с образованием APS было показано у некоторых зеленых серных бактерий и у членов семейства *Chromatiaceae*, но не было детектировано у бактерий семейства *Ectothiorhodospiraceae*.

Вторым способом образования сульфата может быть прямое окисление сульфита сульфитдегидрогеназой (Sog), ферментом, принадлежащим семейству молибдоптериновых сульфитоксидаз, и расположенным в периплазме. Также было выявлено участие другого сульфит-окисляющего фермента - SoeABC. Этот белок состоит из мембранной субъединицы SoeC, удерживающей две цитоплазматические субъединицы, железосерный белок SoeB и молибденсодержащий белок SoeA (Lehmann et al., 2012; Simon & Kroneck, 2013). В исследовании с мутантными штаммами модельного организма *Allochromatium vinosum* было

продемонстрировано, что именно SoeABC играет основную роль в цитоплазматическом окислении сульфита, хотя у этого организма есть и Sat-AprMBA система (Dahl et al., 2013). Альтернативным ферментом, способным окислять образовавшийся сульфит, может быть PSRLC3 комплекс. Эта система гомологична полисульфидредуктазе (PSR) из *Wolinella succinogenes* (Simon & Kroneck, 2013).

Окисление тиосульфата. Многие серные бактерии могут окислять тиосульфат в сульфат при участии периплазматического тиосульфат-окисляющего мультиферментного комплекса (Sox). Этот комплекс был впервые обнаружен у представителей *Alfaproteobacteria* *Paracoccus versutus* и *P. pantotrophus* (Lu et al., 1985; Friedrich et al., 2001). Sox кластер *P. pantotrophus* содержит 15 генов – *soxRSVWXYZABCDEFGH*. Предложенный механизм окисления тиосульфата требует участия четырех периплазматических белков: SoxB, SoxXA, SoxYZ, и SoxCD. Согласно предложенному механизму SoxXA участвует в ковалентном связывании окисленного атома серы из тиосульфата с цистеином белка SoxY с образованием S-тиоцистеина. SoxB действует как сульфат тиол эстераза и ответственен за гидролитическое отщепление сульфата. Внешний атом серы окисляется затем дегидрогеназой SoxCD, после чего SoxB высвобождает вторую молекулу сульфата и тем самым восстанавливает SoxYZ (Friedrich et al., 2001). Позднее было выяснено, что Sox система существует в двух различных версиях, отличающихся наличием или отсутствием SoxCD. Полный *sox* кластер обнаруживается у микроорганизмов, окисляющих тиосульфат напрямую в сульфит; в большинстве бактерий, образующих глобулы серы как промежуточный продукт окисления, гены *soxCD* отсутствуют (Friedrich et al., 2005; Frigaard & Dahl, 2008).

Окисление неорганических серных соединений археями. Ферменты, участвующие в окислении серы у термоацидофильных архей (порядок *Sulfolobales*), значительно отличаются от бактериальных, и у бактерий обнаружены не были. Основная информация о диссимиляционном окислении серы получена при изучении *Acidianus ambivalens* в качестве модельного организма (Kletzin et al., 2004). Первый этап, катализирующий

кислородзависимое диспропорционирование серы с образованием сульфида и сульфита, проходит при участии цитоплазматической серной оксигеназы-редуктазы (SOR) (Ghosh & Dam, 2009). Из серы и сульфита в неферментативной реакции образуется тиосульфат. Кристаллическая структура SOR из *Acidianus ambivalens* показала наличие полый сферы, заключающей в себе наноотделение с неполярными каналами, обеспечивающими доступ для линейных видов серы (Urich et al., 2006). Не выявлено связи этой реакции с запасанием энергии, возможно, она запасается в ходе дальнейшего окисления продуктов (сульфита, тиосульфата и сульфида) в сульфат. Образование сульфата может проходить двумя путями: (а) при участии мембрансвязанной сульфит-оксидоредуктазы или (б) непрямым окислением с участием APR-АРАТ ферментной системы. Окисление тиосульфата в *Acidianus ambivalens* катализирует мембрансвязанный фермент TQO (Barton et al., 2014; Ghosh & Dam, 2009).

Диспропорционирование соединений серы. Биохимические пути диспропорционирования серы и ее соединений являются наименее изученными. Исследования мезофильных диспропорционаторов ограничены двумя видами сульфатредукторов рода *Desulfovibrio*, а также *Desulfocapsa sulfexigens* (Finster, 2008). Было показано, что способность восстанавливать сульфат и диспропорционировать серные соединения у *Desulfovibrio* присутствуют одновременно, и для обоих процессов эти организмы используют один и тот же ферментативный механизм, катализирующий реакции в противоположных направлениях. Секвенирование полноразмерного генома бактерии *Desulfocapsa sulfexigens*, неспособной к сульфатредукции, выявило наличие полного набора генов, необходимых для диссимиляционного восстановления сульфата (Finster et al., 2013). Кроме того, была показана сульфит-оксидоредуктазная активность в бесклеточных экстрактах *D. sulfexigens* (Frederiksen & Finster, 2004). Таким образом, для окисления сульфита диспропорционирующие соединения серы бактерии могут использовать обратный путь сульфатредукции или альтернативный путь с участием сульфит-оксидоредуктазы.

Сведения о термофильных диспропорционаторах серы ограничены анализом генома *Thermosulfurimonas dismutans* (Mardanov et al., 2016). Этот организм также содержит все гены диссимиляционной сульфатредукции, включая гены транспорта электронов, хотя и не может расти за счет восстановления сульфата. Также обнаружены гены, родственные генам роданазы, сульфотрансферазы и TusA белка, которые могут способствовать транспорту серы в клетку. Выявлено несколько генов оксидоредуктаз, которые могут быть вовлечены в восстановление соединений серы и образование сульфида и сульфита из тиосульфата. Гены Sox системы, работающие в аэробных сероокисляющих бактериях, у *T. dismutans* отсутствуют.

Таким образом, микроорганизмы обладают развитой ферментной системой для использования неорганических соединений серы в качестве донора или акцептора электронов для роста и играют основную роль в биогеохимическом цикле серы. Хемотрофные анаэробы переносят электроны на серу и ее окисленные соединения с образованием и накоплением H_2S , тогда как аэробные сероокисляющие прокариоты обеспечивают преобразования восстановленных соединений с образованием сульфата. Хотя в изучении энзимологии продукции и потребления сульфида есть значительные достижения, особенно в восстановлении сульфата и окислении сероводорода мезофильными протеобактериями, необходимы дальнейшие исследования в этой области. В ферментных механизмах потребления и выделения H_2S есть много общего, и будущие исследования могут выявить эволюционные корни процессов окисления и восстановления серы. Более того, важно проследить эволюционные связи между биологическими циклами серы и азота, поскольку схожие компоненты и строение обнаруживаются в ферментах и для восстановления сульфита в сульфид, и для восстановления нитрита в аммоний.

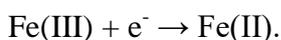
2.3. Цикл железа и восстановление Fe(III) термофильными прокариотами

Железо относится к элементам с переменной валентностью, и имеет разную подвижность в восстановительных и окислительных условиях. В виде железоорганических соединений железо мигрирует легко, в виде FeSO_4 — слабо, а трехвалентное железо подвержено коллоидной миграции. Железо в почве содержится в составе минералов (биотит, амфибол, пироксен), в форме нерастворимых оксидов (лимонит, гетит), железо-гумусовых комплексов, в растворимом виде (FeCO_3 вивианит) (Бабьева и Зенова, 1983). Железо активно вовлекается в биологический круговорот, так как входит в состав многих ферментов, участвует в образовании хлорофилла и входит в состав гемоглобина. Биогеохимические циклы железа зависят от условий увлажнения, реакции среды, степени аэрации почвы, условий разложения органического вещества. Решающая роль в них принадлежит микроорганизмам, использующим разные формы этого элемента для своих энергетических и конструктивных потребностей. Диссимиляционная железоредукция имеет большое экологическое значение в современной биосфере. Окисленные формы железа и марганца вследствие низкой растворимости скапливаются в донных осадках, где их доля может достигать нескольких процентов общего веса (Straub et al., 2001). По сравнению с сульфатом и CO_2 , металлы являются предпочтительными акцепторами и способны ингибировать сульфатредукцию и метаногенез (Nealson & Saffarini, 1994). Эти факторы обуславливают существенный вклад (до 50%) железоредукции в минерализацию органического вещества во многих водных экосистемах (Thamdrup, 2000). Этому также способствует быстрая регенерация продуктов восстановления: растворимые восстановленные формы железа и марганца легко вновь окисляются и возвращаются в осадки. Диссимиляционное восстановление Fe(III) также рассматривается как один из возможных наиболее ранних типов микробного метаболизма, обеспечивавшего окисление основного количества органического вещества в Архее (Walker, 1987; Lovely et al., 2004). Кроме того, есть основания полагать, что в образовании и накоплении железистых кварцитов, из которых

сформировались современные месторождения железных руд, могли участвовать железовосстанавливающие микроорганизмы (Baur et al., 1985; Nealson & Myers, 1990).

Микроорганизмы, окисляющие Fe(II), широко распространены в домене *Bacteria*, а также встречаются в домене *Archaea*. К термофильным железоокисляющим прокариотам относятся представители родов *Alicyclobacillus*, *Sulfobacillus*, *Acidianus* (Jiang et al., 2008; Norris, et al., 1996; Plumb et al., 2007). Образующееся в аэробных условиях трехвалентное железо, при нейтральных значениях pH среды, как правило, осаждается в виде гидроксида. В анаэробных экосистемах трансформацию нерастворимых соединений железа в растворимые осуществляют железовосстанавливающие микроорганизмы.

Восстановление Fe(III) микроорганизмами является частным случаем микробной металлоредукции, которую можно определить, как понижение степени окисления атома металла, вызванное деятельностью микроорганизмов. Железоредукция сопровождается переносом одного электрона, генерируемого в реакциях микробного метаболизма:



Отличительной чертой микробного восстановления железа является использование нерастворимых соединений в качестве акцептора электронов. Большая часть продуктов восстановления откладывается внеклеточно, что легко наблюдается невооружённым глазом по изменению цвета и структуры осадка и образованию минералов с магнитными свойствами (магнетит).

Диссимиляционным восстановлением Fe(III) называют использование его в качестве внешнего акцептора электронов в метаболизме (Lovley, 1991). Диссимиляционное восстановление может быть облигатным (анаэробное дыхание) и факультативным (брожение с экзогенным акцептором электронов), а микроорганизмы, использующие это процесс - это не только «металлдышащие» организмы, но и бродильщики, сбрасывающие часть восстановительных эквивалентов на металл и получающие за счет этого дополнительную энергетическую выгоду. Таким образом, диссимиляционное восстановление железа (III)

можно определить более широко как восстановление Fe(III) для целей иных, чем ассимиляция (Lovley et al. 2004; Слободкин, 2005).

2.3.1. История исследований микробной трансформации соединений железа

О роли микроорганизмов в трансформации соединений железа, в частности, в образовании осадков, содержащих оксид Fe(III), было известно еще с конца XIX века. Так, например, работа С.Н. Виноградского, рассматривавшая образование гидроксида железа нитчатыми бактериями рода *Leptothrix* (Winogradsky, 1888), цитируется в публикации, посвященной участию бактерий в образовании осадков, содержащих оксид трехвалентного железа (Harder, 1919).

Первые исследования восстановления Fe(III) проводились на организмах, растущих, главным образом за счет сбраживания сахаров. В работе Е.В. Рунова, выполненной на Бактериолого-Агрономической Станции в Москве, было показано, что микроорганизмы из образцов почв, а также чистые культуры *Escherichia coli*, *Clostridium pasteurianum*, *Lactobacillus lactis* и другие при росте в анаэробных условиях в присутствии сахаров и гидроксида трехвалентного железа способны восстанавливать окисные соединения железа до закисных (Рунов, 1926). Практически одновременно было показано восстановление Fe(III) анаэробно растущими на среде с глюкозой или пептоном культурами *Clostridium sporogenes* и *E. coli*, (Starkey & Halverson 1927), а позднее сбраживающей глюкозу бактерией *Bacillus polymyxa* (Roberts, 1947). Количественные исследования этого процесса выявили, что менее 5% восстановительных эквивалентов субстрата расходуется на восстановление металла, а основная часть идет на образование продуктов брожения (этанол, лактат, ацетат, водород и др.) Таким образом, основную часть энергии организм получает за счет сбраживания, и только небольшая ее часть поступает от восстановления металла. Брожение с внешним акцептором электронов является примером факультативного диссимиляционного восстановления. Облигатная диссимиляционная железоредукция была впервые

продемонстрирована Балашовой и Заварзиным в 1979 г. (Балашова и Заварзин, 1979). В их экспериментах бактерия *Pseudomonas* sp. росла за счет восстановления гидроксида железа и ферригидрита молекулярным водородом, и этим была доказана возможность получения необходимой для микробного роста энергии исключительно за счет восстановления Fe(III). В 1987-1988 годах практически одновременно вышло несколько статей с описанием микроорганизмов, которые могли использовать для анаэробного роста энергию восстановления окисленных форм железа или марганца (DiChristina et al., 1988; Lovely et al., 1987; 1988; Myers & Nealson, 1988). В этих публикациях приводятся количественные данные, доказывающие, что данные микроорганизмы полностью окисляли несбраживаемые органические соединения, восстанавливая Fe(III) или Mn(IV) в качестве единственных акцепторов электронов, и что этот процесс обеспечивал достаточный для микробного роста выход энергии. Выделенные в ходе этих исследований бактерии *Shewanella oneidensis* MR-1 (ранее называвшаяся *Alteromonas putrefaciens* и затем *Shewanella putrefaciens*) и *Geobacter metallireducens* GS-15, а также и другие представители этих родов стали в дальнейшем модельными объектами для изучения биохимии и механизмов железоредукции. В последующие годы основные исследования в области железоредукции были смещены с железовосстанавливающих бродильщиков в сторону микроорганизмов, использующих Fe(III) как конечный акцептор электронов в дыхательной цепи, поскольку именно они осуществляют бóльшую часть восстановления металлов в окружающей среде (Lovley et al. 2004; Слободкин, 2005; Пиневиц, 2005; Weber et al., 2006).

2.3.2. Термофильные железовосстанавливающие прокариоты

2.3.2.1. Филогенетическое разнообразие

Первым термофильным микроорганизмом, для которого была показана способность восстанавливать трёхвалентное железо, был *Sulfolobus acidocaldarius* (Brock & Gustafson, 1978). Эта архея восстанавливала FeCl₃ молекулярной серой в качестве донора электронов в

микроаэрофильных условиях при температуре 70°C и pH 1.6. Интенсивные исследования термофильной железоредукции начались в середине 90-х годов прошлого века с получения накопительных и чистых культур термофилов, диссимиляционно восстанавливающих Fe(III) (Слободкин и др. 1995; Woone et al., 1995; Greene et al., 1997; Slobodkin et al., 1997; 1999). Способностью к восстановлению железа обладают филогенетически разнородные прокариоты, относящиеся к обоим доменам *Bacteria* и *Archaea* (Таблица 1, 2). Мезофильные железоредукторы присутствуют всего в четырех филумах, *Acidobacteria*, *Deferribacteres*, *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Количество филумов, в которых есть термофильные железоредукторы, значительно превышает это число. К 2004-2005 годам было известно 30 видов железовосстанавливающих термофилов (Lovely et al., 2004; Слободкин, 2005). К настоящему времени число термофильных железовосстанавливающих прокариот увеличилось более чем в два раза и составляет свыше 70 видов. Археи представлены 16 видами гипертермофилов, принадлежащими к филумам *Euryarchaeota* и *Crenarchaeota*. В филуме *Euryarchaeota* железоредукторы обнаружены среди представителей порядков *Archaeoglobales*, *Thermoplasmatales* и *Thermococcales*. Способность к восстановлению железа показана для представителей всех родов, входящих в порядок *Archaeoglobales*; более того, члены рода *Geoglobus* облигатно зависят от наличия Fe(III). Среди *Crenarchaeota* способностью к диссимиляционному восстановлению железа обладают многие виды родов *Acidianus* (порядок *Sulfolobales*) и *Pyrobaculum* (порядок *Thermoproteales*). Более половины термофильных железовосстанавливающих бактерий представлены клостридиями, относящимися к порядкам *Clostridiales* и *Thermoanaerobacterales*. Кроме того, термофильная железоредукция показана для нескольких видов в филумах *Aquificae*, *Deferribacteres*, *Proteobacteria*, *Thermodesulfobacteria*, *Thermotogae* (Таблица 3). В некоторых случаях способность использовать Fe(III) в качестве акцептора электронов показана лишь для одного вида филума. Так, например, *Ardenticatena maritima*, *Melioribacter roseus* и *Thermus scotoductus* (Kawaichi et al., 2013; Podosokorskaya et al., 2013; Kieft et al., 1999; Balkwill et al.,

2004) являются единственными железоредукторами в филумах *Chloroflexi*, *Chlorobi* (*Ignavibacteriae*) и *Deinococcus-Thermus* соответственно.

Восстановление железа не является ни родоспецифичным, ни даже видоспецифичным свойством и может варьировать среди разных штаммов. В частности, при исследовании способности к железоредукции у представителей рода *Thermus* было продемонстрировано, что из 4 исследованных видов только *T. scotoductus* был железоредуктором, и из 5 протестированных штаммов этого вида один не обладал такой способностью (Balkwill et al., 2004). Из четырех известных видов рода *Deferribacter*, *Deferribacter desulfuricans* не способен восстанавливать железо (Takai et al., 2003b). Два из пяти видов *Acidianus* неспособны расти с $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ в качестве акцептора электронов (Plumb et al., 2007). В случае с родами *Anaerobranca* и *Carboxydotherrmus* (Gorlenko et al., 2004; Slobodkin et al., 2006), сначала было показано, что все виды способны восстанавливать железо, однако выделенные затем *A. zavarzinii* и *C. islandicum* (Kevbrin et al., 2008; Novikov et al., 2011) этой способностью не обладали.

Таблица 2. Железоредакции у различных таксонов прокариот

Филум*	Мезофильные	Термофильные
Домен <i>Bacteria</i>		
<i>Acidobacteria</i>	+	+
<i>Actinobacteria</i>	-	+
<i>Aquificae</i>	-	+
<i>Armatimonadetes</i>	-	-
<i>Bacteroidetes</i>	-	-
<i>Caldiserica</i>	-	-
<i>Chlamydiae</i>	-	-
<i>Ignavibacteriae</i>	-	+
<i>Chloroflexi</i>	-	+
<i>Chrysiogenetes</i>	-	-
<i>Cyanobacteria</i>	-	-
<i>Deferribacteres</i>	+	+
<i>Deinococcus-Thermus</i>	-	+
<i>Dictyoglomi</i>	-	-
<i>Elusimicrobia</i>	-	-
<i>Fibrobacteres</i>	-	-
<i>Firmicutes</i>	+	+
<i>Fusobacteria</i>	-	-
<i>Gemmatimonadetes</i>	-	-
<i>Lentisphaerae</i>	-	-
<i>Nitrospira</i>	-	-
<i>Planctomycetes</i>	-	-
<i>Proteobacteria</i>	+	+
<i>Spirochaetes</i>	-	-
<i>Synergistetes</i>	-	-
<i>Tenericutes</i>	-	-
<i>Thermodesulfobacteria</i>	-	+
<i>Thermotogae</i>	-	+
<i>Verrucomicrobia</i>	-	-
Домен <i>Archaea</i>		
<i>Crenarchaeota</i>	-	+
<i>Euryarchaeota</i>	-	+
<i>Korarchaeota</i>	-	-
<i>Nanoarchaeota</i>	-	-
<i>Thaumarchaeota</i>	-	-

* источник: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.(<http://www.bacterio.net>)
на 01.01.2017

2.3.2.2. Физиологическое разнообразие

Температура и pH роста. Способностью к железоредукции обладают многие гипертермофилы, им и принадлежат рекорды в этой области. *Pyrobaculum islandicum* и *P. aerophilum* могут расти при 102 °C и 104°C соответственно (Huber et al., 1987; Volkl et al., 1993). Сообщалось также о восстановлении железа при 121°C археей '*Geogemma barosii*' штамм 121 (Kashefi & Lovley, 2003), однако, дальнейшие сведения о выделении и характеристике этого организма отсутствуют. Самой высокотемпературной бактерией считается '*Geothermobacterium ferrireducens*' с максимальной температурой роста 100°C (Kashefi et al., 2002a). Нижней границей роста термофильных железоредукторов можно считать 25-26°C, о которой сообщалось для членов рода *Tepidimicrobium* (Slobodkin et al., 2006; Niu et al., 2009). Большинство железовосстанавливающих термофильных бактерий имеют минимальную температуру роста 40-50°C, а гипертермофильные археи не растут ниже 65°C (*Geoglobus acetivorans*) и даже 80°C (*Pyrobaculum calidifontis*). Основная часть железоредукторов являются нейтрофилами, однако диапазон pH термофильной железоредукции весьма широк. Оптимальный pH для роста представителей рода *Acidianus* не превышает значения 1.5, что делает их самыми термоацидофильными железоредукторами (Yoshida et al., 2006; Plumb et al., 2007). Рост при наиболее высоких значениях pH показан для представителей рода *Anaerobranca* (до pH 10,5), тестирование восстановления Fe(III) у них проводили при pH 9.5 (Gorlenko et al., 2004).

Доноры электронов. Термофильные железоредукторы в качестве донора электронов используют широкий ряд органических соединений. Наиболее распространенными среди них являются сложные белковые соединения и отдельные аминокислоты, а также органические кислоты, включая жирные кислоты. Гипертермофильные железоредукторы обладают рядом уникальных физиологических способностей. Это единственная группа прокариот, способных полностью минерализовать ацетат при высоких температурах (80°C и выше). Значимость этого факта определяется тем, что ацетат является ключевым

продуктом разложения органического вещества в анаэробных условиях. Многие гипертермофильные археи способны образовывать ацетат в результате брожения, в то же время гипертермофилы, способные использовать ацетат как донор электронов довольно долгое время были неизвестны (Слободкин и др., 1999). Открытие способности *Ferroglobus placidus* и *Geoglobus ahangari* к потреблению ацетата, сопряженному с восстановлением Fe(III) при температурах выше 80°C (Tor et al., 2001), продемонстрировало, что он может полностью разлагаться в экотопах со всеми возможными температурами. Кроме того, *Ferroglobus placidus* может расти за счет анаэробного разложения ароматических соединений (Tor & Lovley, 2001). Представители рода *Geoglobus* способны окислять длинноцепочечные жирные кислоты пальмитат и стеарат (Kashefi et al., 2002b; Slobodkina et al., 2009). Из неорганических доноров электронов многие термофильные железоредукторы могут использовать водород как для автотрофного роста, так и для роста в присутствии органических источников углерода (Слободкин, 2005; Lovley, 2004). Кроме того, донорами электронов для термофильной железоредукции могут служить восстановленные соединения серы (Plumb et al., 2007; Yoshida et al., 2006; Aguiar et al., 2004; Takai et al., 2003a) или монооксид углерода (Слободкин et al., 2006; Slepova et al., 2009; Sokolova et al., 2004; Yoneda et al., 2012; 2013).

2.3.3. Механизмы внеклеточного переноса электронов на Fe(III)

2.3.3.1. Стратегии микробного взаимодействия с нерастворимыми соединениями Fe(III)

В отличие от многих конечных акцепторов электронов, таких как нитрат, нитрит, фумарат, сульфат, сульфит, тиосульфат, (гидр)оксиды железа слабо растворимы в воде при $pH > 4$. Таким образом, для его восстановления необходимы механизмы, обеспечивающие перенос электронов на внеклеточные минералы Fe(III). Для этого может использоваться (1) прямой контакт клетки с поверхностью нерастворимого акцептора или (2) не прямое восстановление с использованием переносчиков электронов по челночному механизму, а

также за счет продукции хелатирующих лигандов (сидерофоров), переводящих железо в состав растворимых комплексных соединений (Weber et al., 2006; Lovely et al., 2004; Hernandez & Newman, 2001).

Прямой контакт клетки с поверхностью восстанавливаемого вещества в течение долгого времени считался необходимым. Разновидностью такого рода контакта можно считать образование особых тонких выростов или пилей («нанопроводов»), которые впервые были обнаружены у *Geobacter metallireducens* (Childers et al., 2002). Удаление гена, кодирующего мономер пилина PilA, приводило к ингибированию восстановления нерастворимого сида Fe(III), при этом сохранялась способность к восстановлению растворимого цитрата железа (Lovley & Malvankar, 2015). Восстановление клетками *Shewanella oneidensis* ферригидрита, заключенного в альгинатных или стеклянных гранулах (Lies et al., 2005; Nevin & Lovley, 2002a), а также регистрация электрического тока при росте биопленок на изоляционном слое, исключаящем контакт с электродом (Jiang et al., 2010), показали возможность непрямого восстановления железа. Для переноса электронов на твердофазный акцептор могут быть использованы растворимые органические вещества-медиаторы (челноки) с низким молекулярным весом, легко меняющие степень окисления, находящиеся в окружающей среде или секретируемые клеткой. Примерами экзогенных переносчиков являются содержащиеся в почвах гуминовые кислоты. Роль челнока в них выполняют хинон-содержащие компоненты (Lovley et al., 1996). Среди эндогенных медиаторов-переносчиков наиболее изученными являются флавины (Covington et al., 2010; von Canstein et al., 2008). Другой стратегией, не требующей прямого контакта клетки с нерастворимыми формами железа, является хелирование - образование комплексных соединений (хелатов), в которых железо переходит в растворимую в воде форму. Использование этого механизма в диссимиляционном восстановлении железа продемонстрировано лишь для двух бактерий: *Geothrix fermentans* и *Shewanella algae* (Nevin & Lovley 2002a, b).

Информации, касающейся стратегий восстановления нерастворимого железа термофилами, не так много. Необходимость прямого контакта и отсутствие растворимых медиаторов электронного транспорта продемонстрированы для представителей родов *Thermincola* и *Thermoanaerobacter* в микробных топливных элементах (Wrighton et al., 2011; Marshall & May, 2009; Bhowmick et al., 2009). В экспериментах с ферригидритом, заключенным в альгинатные гранулы, было продемонстрировано, что *Carboxydothemus ferrireducens* не способен использовать железо, недоступное для прямого контакта с клетками. Было также показано, что в дополнение к основной стратегии прямого контакта, *C. ferrireducens* может использовать экзогенные медиаторы (челноки электронов и хелирующие агенты) для непрямого восстановления железа (Gavrilov et al., 2012). Необходимость прямого контакта для восстановления ферригидрита была установлена для гипертермофильных архей родов *Geoglobus* и *Ferroglobus* (Manzella et al., 2013; Mardanov et al., 2015; Smith et al., 2015). Было также выяснено, что *G. ahangari* и *F. placidus* так же, как и *C. ferrireducens* могут использовать экзогенные челноки электронов, но не хелаторы для непрямого восстановления железа (Manzella et al., 2013). У обоих видов *Geoglobus*, а также *F. placidus* и *C. ferrireducens* отмечалось наличие пилеподобных выростов при культивировании с Fe(III), причем образование этих структур у *C. ferrireducens* индуцировалось присутствием ферригидрита (Manzella et al., 2013; Mardanov et al., 2015; Smith et al., 2015; Gavrilov et al., 2012). Однако, несмотря на то что большинство исследованных (гипер)термофильных прокариот требует прямого контакта с поверхностью восстанавливаемого акцептора и образует пилеподобные структуры, говорить о едином механизме термофильной железоредукции нельзя. Так, разные виды гипертермофильных архей рода *Pyrobaculum* используют разные стратегии: *P. islandicum* и *P. calidifontis* требуется прямой контакт клетки с ферригидритом, тогда как *P. aerophilum* и *P. arsenaticum* могут восстанавливать железо без прямого контакта, используя, видимо, челночные переносчики электронов (Feinberg & Holden, 2006; Feinberg et al., 2008).

2.3.3.2. Исследование биохимических и молекулярных механизмов железоредукции

Для восстановления нерастворимых (гидр)оксидов необходим перенос электронов из цитоплазмы, где они генерируются в процессе окисления субстрата, через цитоплазматическую мембрану (и через внешнюю в случае грамотрицательных бактерий) к месту восстановления железа. Основные исследования в этой области проводили с мезофильными грамотрицательными протеобактериями родов *Shewanella* и *Geobacter*. Существенным инструментом для понимания биохимических механизмов функционирования электронтранспортной цепи стало полногеномное секвенирование прокариот. Первыми диссимиляционно-восстанавливающими железом бактериями, для которых было проведено такое секвенирование, стали *S. oneidensis* MR-1 (Heidelberg et al., 2002) и *G. sulfurreducens* PCA (Methe et al., 2003). Анализ геномов этих организмов выявил необычно большое, нехарактерное для других бактерий, количество генов, кодирующих цитохромы *c*, причем большая часть этих цитохромов, содержала несколько генов. В настоящее время наиболее хорошо изучены мультигемные цитохромы у *S. oneidensis* MR-1, и предложена модель дыхательной цепи (Weber et al., 2006; Shi et al., 2007; Breuer et al., 2015). Согласно этой модели, в переносе электронов участвуют тетрагемный цитохром *c*, (названный CymA) и белковый комплекс MtrCAB, в состав которого входят два декагемных цитохрома *c*, расположенных во внешней мембране. Каким образом происходит перенос электронов в периплазме от CymA, расположенного во внутренней мембране к MtrA, входящему в комплекс, находящийся во внешней мембране клетки, пока неясно. Информация о локализации белка MtrA также противоречива (Richter et al., 2012).

Другой модельный металлдышащий организм, *G. sulfurreducens*, является чемпионом по количеству генов цитохромов *c*, в том числе мультигемных (Methe et al., 2003). В геноме *G. sulfurreducens* содержатся гены, кодирующие, как минимум, 30 цитохромов, связанных с внешней мембраной. Для некоторых из них (Omc B, -S, -T, -E) было экспериментально

показано, что они необходимы для роста за счет восстановления Fe(III) или электродов (Leang et al., 2003; Afkar et al., 2005; Mehta et al., 2005).

В отличие от *Shewanella* spp., виды рода *Geobacter* не могут восстанавливать Fe(III) в отсутствие прямого контакта клетки с минералом. Отличительной особенностью *Geobacter* spp. является наличие особых пилей («нанопроводов»), так называемых пилей IVa типа. Было показано, что у *G. sulfurreducens* пили обладают электропроводимостью, и транспорт электронов по всей их длине осуществляется без участия цитохромов, а ключевыми компонентами в переносе электронов являются ароматические аминокислоты (Reguera et al., 2005; Vargas et al., 2013; Lovley & Malvankar, 2015).

О биохимических механизмах термофильной железоредукции известно значительно меньше. Изучались две бактерии, принадлежащие к филуму *Firmicutes*, которые в отличие от мезофильных модельных организмов, являются грамположительными. Из мембранной фракции клеток *Carboxydotherrmus ferrireducens* был выделен ферментный комплекс, восстанавливающий Fe(III)-ЭДТА, и состоящий из цитохромов с и белка с молекулярной массой около 115 кДа, состоящего из двух полипептидов (Гаврилов и др., 2007). Позднее было показано, что этот комплекс не может взаимодействовать с нерастворимым железом, и, возможно, является переносчиком электронов на цитохромы, связанные с S-слоем клеточной стенки, которые и обеспечивают перенос электронов на внеклеточный нерастворимый акцептор (Gavrilov et al., 2012). Анализ генома '*Thermicola potens*' выявил необычно большое по сравнению с другими грамположительными бактериями количество генов мультигемовых цитохромов с (Burne-Bailey et al., 2010). Были получены биохимические и биофизические доказательства того, что эти цитохромы находятся на поверхности клетки или в клеточной стенке (Carlson et al., 2012). На основании этих данных и обнаружению в геноме последовательностей, кодирующих мультигемовые цитохромы и гидрогеназы с предполагаемой периплазматической локализацией, была предложена схема транспорта электронов, схожая с таковой у грамотрицательных бактерий. Однако сами авторы отмечают

недостаточность данных для подтверждения предположений о функциях и локализации белков железоредукции (Carlson et al., 2012). Некоторые данные получены об электронтранспортной цепи умеренно-термофильной рамотрицательной бактерии *Melioribacter roseus* РЗМ-2, представляющей недавно описанный новый филум *Ignavibacteriae* (Podosokorskaya et al., 2012). Анализ генома этой бактерии выявил гены 13 цитохромов с, содержащих от 4 до 14 гемов. Показано, что три из них вместе с геном белка внешней мембраны образуют оперон, гомологичный оперонам *omcB*, кодирующим железовосстанавливающий комплекс внешней мембраны у *Geobacter* spp. Кроме того, обнаружен генный кластер, кодирующий трансмембранные белки и периплазматический мультигемовый цитохром, также имеющий гомологию с периплазматическими переносчиками электронов у *Geobacter* spp. (Podosokorskaya et al., 2012).

Изучение железовосстанавливающих способностей гипертермофильных архей основано, главным образом, на анализе полных геномов *Geoglobus acetivorans*, *G. ahangari* и *Ferroglobus placidus*, публикации о которых появились практически одновременно (Mardanov et al., 2015; Manzella et al., 2015; Smith et al., 2015). Так же, как и у мезофильных и термофильных бактерий, у железовосстанавливающих архей значительно больше генов мультигемовых цитохромов с, чем у неспособных к железоредукции. Также у всех этих архей были обнаружены гомологи генов, кодирующих белки, необходимые для сборки пилей. Дополнительно было продемонстрировано, что *G. ahangari* использует гемосодержащие поверхностные белки для транспорта через клеточную стенку на нерастворимый оксид Fe(III) (Manzella et al., 2013). Кроме того, биохимические, геномные и транскриптомные опыты указывают на то, что для восстановления растворимых и нерастворимых форм Fe(III) используются разные белки. В отличие от исследуемых представителей филума *Euryarchaeota*, у *Crenarchaeota* рода *Pyrobaculum* механизм восстановления железа, видимо, варьирует у разных видов. В геноме *P. calidifontis* содержится октагемовый цитохром с, гомологичный цитохрому с у *Shewanella oneidensis* и

Geobacter sulfurreducens. В то же время *P. aerophilum* и *P. islandicum* имеют всего 2 и 1 моногемных цитохрома с соответственно, и ни одного мультигемового, что указывает на то, что железоредукция у них идет по другому механизму, не требующему участия цитохромов с (Smith et al., 2015; Feinberg et al., 2008).

Таким образом, представления об электронтранспортных путях железоредукции находятся в стадии становления даже для модельных организмов. В настоящее время для предсказания микробного метаболизма в конкретных условиях могут быть использованы анализ полноразмерных геномов и последующее формирование физиологических моделей *in silico*. Удалось выявить и охарактеризовать некоторые белки, непосредственно участвующие в переносе электронов на Fe(III). Становится все более очевидным, что ключевыми участниками электронтранспортной цепи как у мезофильных, так и у (гипер)термофильных прокариот являются мультигемовые цитохромы с, однако, механизмы переноса электронов все еще неясны. В целом, сведения о роли и функциях мультигемовых цитохромов в процессе восстановления железа носят во многом предположительный характер. Нерешенным остается вопрос, почему такое большое количество разнообразных мультигемных цитохромов с, значительно превышающее число непосредственно вовлеченных в восстановление железа, экспрессируется в периплазме при росте клеток с оксидом железа. Возможно, некоторые из них используются для временного запаса и хранения электронов (Richter et al., 2012). Кроме того, как показал сравнительный анализ геномов шести видов рода *Geobacter*, за исключением одного белка (PpcA), имеющего гомологов в каждом из исследованных геномов, ни одна из нуклеотидных последовательностей цитохромов, участвующих в восстановлении железа не является консервативной. Отмечается также наличие паралогов, т.е. дубликации генов, кодирующих внешнечелочные цитохромы, что также было замечено и в геноме *S. oneidensis*. Авторы, в связи с этим предполагают, что мультигемовые цитохромы, расположенные на внешней мембране, не являются специфическими конечными железоредуктазами, а скорее служат для

неспецифического стока от электрон-транспортной цепи внутренней мембраны на внеклеточный акцептор (Butler et al., 2010). Не исключено также, что эти белки все же приспособлены для специфичного восстановления, но нам точно неизвестна та химическая и физическая форма, в которой находится конечный акцептор электронов. Механизмы железоредукции изучают с искусственно синтезированными железосодержащими соединениями, главным образом с ферригидритом, тогда как в природе микроорганизмы имеют дело с реальными минералами почв, осадков и глин. Наличие кажущегося избыточным количества цитохромов может отражать разнообразие форм существования Fe(III) в окружающей среде.

Таблица 3. Роды термофильных анаэробных прокариот, представители которых способны к восстановлению железа и нитрата, и трансформации соединений серы

Археи

Филум	Восстановление				Окисление S ⁰ и ее соединения
	Fe ³⁺	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	S ⁰	
<i>Crenarchaeota</i>	<i>Acidianus</i>	<i>Pyrobaculum</i> (N ₂)	<i>Caldivirga</i>	<i>Acidianus</i>	<i>Acidianus</i>
	<i>Pyrobaculum</i>	<i>Pyrolobus</i> (NH ₄ ⁺)	<i>Thermocladium</i>	<i>Acidilobus</i>	<i>Pyrobaculum</i> (S ₂ O ₃ ²⁻)
			<i>Thermoproteus</i>	<i>Caldisphaera</i>	
				<i>Caldivirga</i>	
				<i>Desulfurococcus</i>	
				<i>Hyperthermus</i>	
				<i>Ignicoccus</i>	
				<i>Pyrobaculum</i>	
				<i>Pyrodictium</i>	
				<i>Staphylothermus</i>	
				<i>Stetteria</i>	
				<i>Stygiolobus</i>	
				<i>Sulfurisphaera</i>	
				<i>Thermocladium</i>	
				<i>Thermofilum</i>	
			<i>Thermogladius</i>		
			<i>Thermoproteus</i>		
			<i>Vulcanisaeta</i>		
<i>Euryarchaeota</i>	' <i>Aciduliprofundum</i> '	<i>Ferroglobus</i> (NO ₂ ⁻ +NO, N ₂ O)	<i>Archaeoglobus</i>	<i>Methanocaldococcus</i>	<i>Ferroglobus</i> (H ₂ S)
	<i>Archaeoglobus</i>		<i>Palaeococcus</i>	<i>Palaeococcus</i>	
	<i>Ferroglobus</i>			<i>Pyrococcus</i>	
	<i>Geoglobus</i>			<i>Thermococcus</i>	
				<i>Methanocaldococcus</i>	

Таблица 3 (продолжение)

Бактерии

Филум	Восстановление				Окисление
	Fe ³⁺	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	S ⁰	S ⁰ и ее соединения
<i>Acidobacteria</i>	<i>Thermoanaerobaculum</i>			<i>Thermotomaculum</i>	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Aciditerrimonas</i>				
<i>Aquificae</i>	<i>Sulfurihydrogenibium</i>	<i>Aquifex</i> (NO ₂ +N ₂)		<i>Balnearium</i>	<i>Aquifex</i>
		<i>Desulfurobacterium</i> (NH ₄ ⁺)		<i>Desulfurobacterium</i>	<i>Hydrogenivirga</i>
		<i>Hydrogenivirga</i> (N ₂)		<i>Persephonella</i>	<i>Persephonella</i>
		<i>Persephonella</i> (N ₂)		<i>Phorcysia</i>	<i>Sulfurihydrogenibium</i>
		<i>Phorcysia</i> (NH ₄ ⁺)		<i>Sulfurihydrogenibium</i>	
		<i>Sulfurihydrogenibium</i> (N ₂)		<i>Thermosulfidibacter</i>	
		<i>Thermovibrio</i> (NH ₄ ⁺)		<i>Thermovibrio</i>	
<i>Caldiserica</i>				<i>Caldisericum</i>	
<i>Calditrichaeota</i>		<i>Caldithrix</i> (NH ₄ ⁺)			
<i>Chloroflexi</i>	<i>Ardenticatena</i>	<i>Ardenticatena</i> (N ₂)			
<i>Deferribacteres</i>	<i>Deferribacter</i>	<i>Calditerrivibrio</i> (NH ₄ ⁺)		<i>Deferribacter</i>	
		<i>Deferribacter</i> (NO ₂ ⁻ , NH ₄ ⁺)			
<i>Deinococcus- Thermus</i>	<i>Thermus</i>	<i>Oceanithermus</i> (NO ₂ ⁻)		<i>Oceanithermus</i>	
		<i>Rhabdothermus</i> (NO ₂ ⁻)		<i>Rhabdothermus</i>	
		<i>Vulcanithermus</i> (NO ₂ ⁻)			
<i>Firmicutes</i>	<i>Anaerobranca</i>	<i>Ammonifex</i> (NH ₄ ⁺)	<i>Ammonifex</i>	<i>Ammonifex</i>	
	<i>Anoxybacter</i>	<i>Anoxybacillus</i> (NO ₂ ⁻)	<i>Brassicibacter</i>	<i>Anaerobranca</i>	
	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> (NO ₂ ⁻)	<i>Desulfotomaculum</i>	<i>Anoxybacter</i>	
	<i>Calderihabitans</i>	<i>Caldinitratiruptor</i> (NO ₂ ⁻)	<i>Desulfovirgula</i>	<i>Brockia</i>	

Таблица 3 (продолжение)

	<i>Caloramator</i>	<i>Carboxydocella</i> (NH ₄ ⁺)	<i>Desulfurispora</i>	<i>Caldanaerobacter</i>	
	<i>Caloranaerobacter</i>	<i>Garciella</i> (NH ₄ ⁺)	<i>Thermacetogenium</i>	<i>Caldanaerovirga</i>	
	<i>Carboxydocella</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Thermodesulfobium</i>	<i>Caloramator</i>	
	<i>Carboxydothemus</i>	<i>Microaerobacter</i> (N ₂)		<i>Carboxydothemus</i>	
	<i>Desulfotomaculum</i>	<i>Moorella</i> (NH ₄ ⁺)		<i>Clostridium</i>	
	<i>Fervidicella</i>	<i>Natranaerobaculum</i> (NH ₄ ⁺)		<i>Desulfotomaculum</i>	
	<i>Fervidicola</i>	<i>Natranaerobius</i> (NH ₄ ⁺)		<i>Desulfovirgula</i>	
	<i>Moorella</i>	<i>Natronovirga</i> (NH ₄ ⁺)		<i>Desulfurispora</i>	
	<i>Natranaerobaculum</i>	<i>Tepidibacillus</i> (NO ₂ ⁻)		<i>Fervidicola</i>	
	<i>Natranaerobius</i>	<i>Tepidimicrobium</i> (нД)		<i>Sporanaerobacter</i>	
	<i>Tepidimicrobium</i>	<i>Thermoanaerobacter</i>		<i>Tepidibacillus</i>	
	<i>Thermincola</i>	<i>Thermodesulfobium</i>		<i>Tepidibacter</i>	
	<i>Thermoanaerobacter</i>	<i>Thermovenabulum</i>		<i>Tepidimicrobium</i>	
	<i>Thermolithobacter</i>	<i>Vulcanibacillus</i> (NO ₂ ⁻)		<i>Thermoanaerobacter</i>	
	<i>Thermosinus</i>			<i>Thermobrachium</i>	
	<i>Thermotalea</i>			<i>Thermosediminibacter</i>	
	<i>Thermovenabulum</i>			<i>Thermotalea</i>	
				<i>Thermovenabulum</i>	
				<i>Thermovirga</i>	
<i>Ignavibacteriae</i>	<i>Melioribacter</i>				
<i>Nitrospirae</i>	<i>Thermodesulfovibrio</i>	<i>Thermodesulfovibrio</i>	<i>Thermodesulfovibrio</i>		
<i>Planctomycetes</i>		<i>Thermogutta</i> (NH ₄ ⁺)		<i>Thermogutta</i>	
		<i>Thermostilla</i> (NO ₂ ⁻)		<i>Thermostilla</i>	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Acidicaldus</i>	<i>Caminiabacter</i> (NH ₄ ⁺)	<i>Desulfacinum</i>	<i>Caminiabacter</i>	<i>Dissulfuribacter</i>
	<i>Deferrisoma</i>	<i>Cetia</i> (NH ₄ ⁺)	<i>Desulfomicrobium</i>	<i>Cetia</i>	<i>Inmirania</i>
	<i>Dissulfuribacter</i>	<i>Dissulfuribacter</i> (NH ₄ ⁺)	<i>Desulfonauticus</i>	<i>Deferrisoma</i>	<i>Piezobacter</i>
	<i>Geothermobacter</i>	<i>Geothermobacter</i> (NH ₄ ⁺)	<i>Desulfosoma</i>	<i>Desulfonauticus</i>	<i>Thermothrix</i> (HS ⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , SO ₃ ⁻)

Таблица 3 (окнчание)

		<i>Hydrogenimonas</i> (NH ₄ ⁺)	<i>Desulfothermus</i>	<i>Desulfurella</i>	<i>Thioprofundum</i>
		<i>Inmirania</i> (N ₂)	<i>Thermodesulforhabdus</i>	<i>Hippea</i>	
		<i>Nautilia</i> (NH ₄ ⁺)		<i>Hydrogenimonas</i>	
		<i>Nitratiruptor</i> (N ₂)		<i>Lebetimonas</i>	
		<i>Piezobacter</i> (N ₂ O)		<i>Nautilia</i>	
		<i>Tepidiphilus</i> (N ₂ O)			
		<i>Thermothrix</i> (NO ₂ ⁻)			
		<i>Thioprofundum</i> (N ₂ O+N ₂)			
<i>Synergistetes</i>				<i>Anaerobaculum</i>	
				<i>Thermanaerovibrio</i>	
<i>Thermodesulfobacteria</i>	' <i>Geothermobacterium</i> '	<i>Thermosulfurimonas</i> (NH ₄ ⁺)	<i>Thermodesulfatator</i>	<i>Caldimicrobium</i>	<i>Thermosulfurimonas</i>
	<i>Thermodesulfobacterium</i>	<i>Thermosulfuriphilus</i> (NH ₄ ⁺)	<i>Thermodesulfobacterium</i>		<i>Thermosulfuriphilus</i>
<i>Thermotogae</i>	<i>Athalassotoga</i>		<i>Kosmotoga</i>	<i>Defluviitoga</i>	
	<i>Thermotoga</i>		<i>Thermococcoides</i>	<i>Fervidobacterium</i>	
				<i>Geotoga</i>	
				<i>Kosmotoga</i>	
				<i>Marinitoga</i>	
				<i>Mesoaciditoga</i>	
				<i>Oceanotoga</i>	
				<i>Petrotoga</i>	
				<i>Thermococcoides</i>	
				<i>Thermosipho</i>	
				<i>Thermotoga</i>	
	Fe ³⁺	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	S ⁰	S ⁰ и ее соединения
Филум	Восстановление				Окисление

В скобках указаны продукты восстановления нитрата и иные, чем сера, окисляемые соединения.

Жирным выделены данные об организмах и/или их свойствах, полученные впервые в настоящем исследовании.

Таким образом, исследования термофильных прокариот, использующих в энергетическом метаболизме соединения азота, серы и железа, показали, что они играют основополагающую роль в циклических превращениях этих основных биогенных элементов, в термальных экосистемах. Изучение роли микроорганизмов в основных биогеохимических циклах ведется уже более ста лет, однако постоянное обновление информации свидетельствует о том, что наши знания о микробиологии основных биогеохимических циклов нельзя считать полными, и продолжение их изучения не перестает быть актуальным.

За последнее десятилетие произошло необычайно быстрое развитие технологий определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК. Эти технологии обеспечили, в частности, качественно новый уровень изучения микробного разнообразия в различных экосистемах, а также поиска новых биокатализаторов. Доступность большого количества полноразмерных геномов микроорганизмов сделали возможным их сравнение и выявление потенциальных механизмов и схем регуляции метаболических путей, в том числе путей энергетического обмена, что вызвало новый виток интереса к изучению трансформации азота, серы и железа микроорганизмами. С другой стороны, информация, основанная на анализе геномов, является, во-многом, гипотетической. Она позволяет делать лишь предварительные выводы и требует экспериментальной проверки. Энзиматические и биохимические данные требуются для выяснения *in vivo* и *in situ* функционирования, регуляции и кинетики метаболических путей. Для более полного понимания биогеохимических циклов и их взаимодействий необходимо изучение микроорганизмов, осуществляющих отдельные стадии циклов, и условий, влияющих на доминирование того или иного процесса в окружающей среде. Такое осмысление сделает возможным и практическое использование микробной активности в биотехнологии. Наиболее доступным и прямым средством для решения этих задач в настоящее время служат традиционные культивационные методы и работа с чистыми культурами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Природные образцы

Образцы осадков, воды, минеральных и биологических образований из наземных и морских мелководных природных систем, характеризующихся повышенными температурами, были отобраны в ходе экспедиций, организованных и проводимых лабораторией гипертермофильных микробных сообществ ИНМИ РАН (Камчатка 2008, 2010 гг., о-в Кунашир 2014 г.). Пробы из глубоководных морских гидротерм были отобраны в совместных с соавторами публикаций научных рейсах (гидротермальное поле Ашадзе, Срединно-Атлантического Хребта 2007 г. и четыре гидротермальных поля бассейна Лау, относящегося к задуговому срединговому центру юго-западной части Тихого океана 2009 г.). Пробы из подземных местообитаний были любезно предоставлены сотрудником лаборатории нефтяной микробиологии ИНМИ РАН Борзенковым И.А. (Северо-Ставропольское газохранилище) и проф. Университета Блумфонтейта (ЮАР) ван Херден Э. (шахта Беатрикс).

Основные характеристики и места отбора проб, использованных в работе, представлены в таблицах 4 и 5.

Таблица 4. Характеристики природных образцов, использованных для получения накопительных культур литоавтотрофных сероокисляющих нитратредукторов и сульфитредукторов

Обозначение	Место отбора	Описание пробы	T, °C	pH
M4	Камчатка, Дачные источники, активная площадка, в. Мутновский	Черный осадок и вода	60	6.0
M9	Камчатка, Дачные источники, активная площадка, в. Мутновский	Черный осадок и вода	70	6.3
K20	Камчатка, берег р. Карымши. Карымшинские источники	Осадок и вода	72	7.4
K21	Камчатка, берег р. Карымши. Карымшинские источники	Осадок и вода	60	7.2
заварзин	Камчатка, кальдера Узон, грифон Заварзин	Вода и осадок	60	6.0
Нефтяная площадка	Камчатка, кальдера Узон, Нефтяная площадка2	Вода и осадок	90	6.0
P1	Камчатка, вулкан Мутновский, Активная площадка	Микробный мат на каменном склоне	50	6.5
P12	Камчатка, кальдера Узон, возле источника Бурлящий	Осадок и микробный мат с края гидротермы	58	6.5
P14	Камчатка, кальдера Узон возле источника Бурлящий	Осадок и микробный мат из небольшого источника	62	6.5
3431	Камчатка, кальдера Узон, ручей Термофильный	Вода и обрастания	67	6.1
23	Кунашир, мелководные Южно-Алехинские источники	Вода, водоросли, песок	86-94	8.2
24	Кунашир, Горячий пляж, севернее мыса Горячий	Горячая вода с песком из гидротермального выхода в полосе прибоя	52-97	7,4

Таблица 4 (окончание)

4А	Кунашир, Южно-Алехинские морские источники	Гидротермальный флюид, вода и обрастания вокруг выхода	50-100	6,5
7А	Кунашир, Южно-Алехинские морские источники	Гидротермальный флюид, вода и обрастания вокруг выхода	50-70	6,5-7,0
36Н	Кунашир, Нескученские источники, мелководная гидротерма	Песок и флюид из верхней части гидротермальной постройки	80-117	6.5
37Н	Кунашир, Нескученские источники, мелководная гидротерма	Песок из средней части гидротермальной постройки	80	6.0-6.5
38Н	Кунашир, Нескученские источники, мелководная гидротерма	Донные отложения, песок и флюид	69-84	6.0-6.5
8	Кунашир, кальдера Головнина, оз. Кипящее	Вода и черный песок	72	6.0
9	Кунашир, кальдера Головнина, оз. Кипящее	Вода, песок, глинистый осадок	67	6.0
10	Кунашир, кальдера Головнина, оз. Кипящее	Вода и черный песок	80	6.5
18	Кунашир, кальдера Головнина, оз. Кипящее	Мутная вода в месте выхода газа	73	7.0
32	Кунашир, Нескученские источники, источник Белый ключ	Вода, песок и глина	73	7.0
Mar 437, Mar443	Спрединговый центр Лау, поле Маринер (Mariner), Тихий океан	Фрагмент глубоководной гидротермальной постройки		
ABE435	Спрединговый центр Лау, поле АВЕ, Тихий океан	Фрагмент глубоководной гидротермальной постройки		
Tahi Moana	Спрединговый центр Лау, поле Тахи Моана (Tahi Moana), Тихий океан	Фрагмент глубоководной гидротермальной постройки		
Tui Malila	Спрединговый центр Лау, поле Туи Малила, (Tui Malila) Тихий океан	Фрагмент глубоководной гидротермальной постройки		

Таблица 5. Характеристики природных образцов, использованных для получения накопительных культур термофильных железовосстанавливающих прокариот

Обозначение	Место отбора	Описание пробы	Т, °С	pH
1814	Узон, Оранжевое поле	Черный крупнозернистый осадок из небольшого источника	76–80	6.6
1835	Узон, ручей Извилистый	Серый осадок из горячего источника в ложе ручья с отложениями серы и железа по краям	77–86	6.2–6.5
1850	Узон, Восточное поле	Черный осадок из небольшого источника с белыми нитчатыми обрастаниями	78	6.2
1860	Узон, озеро Фумарольное	Бурый глинистый осадок из мелководного источника у края озера	84	6.8
1861	Узон, участок Тростниковый	Черный осадок из источника с охристыми отложениями	60	6.2
1864	Долина Гейзеров, горячий ручей из гейзера Грот	Черный осадок из горячего ручья с бурым дном и высшей растительностью по краям	78	7.7
Ch2, Ch3	Гидротермальное поле Ашадзе, Атлантический океан	Фрагмент глубоководной гидротермальной постройки		
3R1, 18R1	Спрединговый центр Лау, поле АБЕ (ABE), Тихий океан	Фрагмент глубоководной гидротермальной постройки		
9R1, Tui Malila	Спрединговый центр Лау, поле Туи Малила, (Tui Malila) Тихий океан	Фрагмент глубоководной гидротермальной постройки		
3R3	Спрединговый центр Лау, поле Маринер (Mariner), Тихий океан	Фрагмент глубоководной гидротермальной постройки		
Tahi Moana	Спрединговый центр Лау, поле Тахи Моана (Tahi Moana), Тихий океан	Фрагмент глубоководной гидротермальной постройки		

Состав сред и условия культивирования

Для получения и культивирования накопительных и чистых культур термофильных микроорганизмов были использованы несколько сред разного минерального состава.

Низкоминерализованная среда (среда F) (модифицированная «среда Пфеннига» (Pfennig 1965), изменена концентрация бикарбоната) содержала (в г на 1 литр дистиллированной воды): 0.33 KH_2PO_4 ; 0.33 NH_4Cl ; 0.33 KCl ; 0.33 $\text{MgCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0.33 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 2.0 NaHCO_3 .

Среда морской солёности I (среда DS) содержала (в г на 1 литр дистиллированной воды): 18.0 NaCl ; 4.0 $\text{MgCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0.33 KH_2PO_4 ; 0.33 NH_4Cl ; 0.33 KCl ; 0.33 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 2.0 NaHCO_3 .

Во все среды добавляли 1 мл/л одного из двух растворов микроэлементов и 1 мл/л раствора витаминов.

Раствор микроэлементов по (Slobodkin et al., 1997) (ммоль на 1 литр дистиллированной воды): 2.0 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \times \text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 2.0 Na_2SO_4 ; 1.0 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 1.0 $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 0.5 $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$; 0.5 $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0.5 Na_2SeO_3 ; 0.1 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0.1 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0.1 H_3BO_3 ; 0.01 $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$.

Раствор микроэлементов по (Slobodkin et al., 2012) (ммоль на 1 литр дистиллированной воды): 2.0 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \times \text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 1.0 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 1.0 $\text{NiCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0.1 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0.1 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0.5 $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0.01 $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0.5 Na_2SeO_4 ; 0.1 H_3BO_3 ; 1.0 $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$; 0.05 SrSO_4 ; 0.01 CrO_3 ; 0.1 $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 0.1 BaCl_2 ; 0.5 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$; 1.0 KBr ; 1.0 KJ ; 5.0 Na_2SO_4 .

Раствор витаминов содержал (в мг на 1 литр дистиллированной воды): 20.0 биотина; 200 фолиевой кислоты; 100.0 пиридоксин гидрохлорида; 50.0 рибофлавина; 50.0 тиамина; 50.0 никотиновой кислоты; 50.0 пантотеновой кислоты; 1.0 кобаламина; 50.0 п-аминобензойной кислоты; 50.0 липоевой кислоты (Wolin et al., 1963).

Все среды готовили анаэробно с применением модифицированной техники Хангейта (Жилина и Заварзин, 1978; Ljungdahl & Wiegel, 1986) под CO_2 (100% в газовой фазе). pH всех

сред доводили до значения 6.5-6.8 (при 25°C) добавлением 10% (вес/об.) NaOH. Как правило, среды не содержали восстанавливающих агентов. При использовании сред, предварительно восстановленных $\text{Na}_2\text{S}\times 9\text{H}_2\text{O}$, в них также добавляли резазурин (конечная концентрация – 1.0 мг/л).

Нерастворимый оксид Fe(III) готовили путём титрования раствора $\text{FeCl}_3\times 6\text{H}_2\text{O}$ (60 г/л) раствором NaOH (10% (вес/об.)) до pH 8.0 - 9.0. В дальнейшем в работе для обозначения этого вещества используется более общий термин ферригидрит.

Нерастворимый оксид Mn(IV) готовили путем окисления кислородом воздуха раствора $\text{MnCl}_2\times 4\text{H}_2\text{O}$ (20 г/л) в щелочных условиях (NaOH (4% (вес/об.)), pH 12.5-13.0) (Feng et al., 2004). Перед добавлением в среду pH доводили до 8.0-8.5 при помощи CO_2 .

Среду для культивирования разливали по 10 мл в предварительно заполненные CO_2 пробирки Хангейта (Bellco Glass, NJ) объёмом 17 мл. Для исследования роста за счет диспропорционирования элементарной серы, а также роста в аэробных и/или микроаэробных условиях использовали флаконы объёмом 50 мл, закрытые резиновыми пробками и завинчивающимися колпачками, содержащие 10 мл жидкой среды. Среды стерилизовали автоклавированием при 135°C (2 ати) в течение 60 минут. Пересевы осуществляли анаэробно стерильными одноразовыми шприцами.

Для выделения органотрофных нитратредукторов использовали среды, содержащие 0.2 г/л дрожжевого экстракта и органические доноры электронов. В случае с литоавтотрофными нитратредукторами среды не содержали органических компонентов за исключением витаминов; элементарная сера и нитрат были добавлены в качестве донора и акцептора электронов. Среды для выделения сульфитредукторов также не содержали органических компонентов за исключением витаминов; в качестве донора электронов использовали молекулярный водород (H_2/CO_2 (80:20) в газовой фазе). В качестве акцептора электронов использовали сернистый газ (SO_2/CO_2 (15:85) в газовой фазе) или сульфит натрия (5 мМ). Единственным источником углерода служил CO_2 /бикарбонат. Для получения

железо- и марганцевосстанавливающих накопительных культур в качестве в качестве донора электронов использовали молекулярный водород (H_2/CO_2 (80:20) в газовой фазе), ацетат, лактат, метанол, дрожжевой экстракт или альгинат.

Накопительные культуры получали инокулированием культивационной среды 10% (об.) пробы и инкубированием при 50, 60, 65 или 80°C в темноте. После трёх успешных 10% пересевов чистые культуры получали методом последовательных десятикратных разведений (2-5 раз) и/или получением колоний в толще агара (1.5% Vasto Agar). Чистота культуры подтверждалась постоянным микроскопированием в различных условиях культивирования, секвенированием гена 16S рРНК (или полногеномного секвенирования) и, в некоторых случаях, ДГГЭ-анализом.

Определение морфологических, физиологических и метаболических свойств

Микроскопия. Морфологию и рост клеток изучали при помощи световой фазово-контрастной микроскопии (микроскопы Микмед 1, ЛОМО или CX-41, Olympus). Количество клеток определяли прямым подсчетом. При использовании сред с ферригидритом пробу (0.1 мл) разводили в 3 раза раствором оксалат аммония (28 г/л)/ щавелевая кислота (15 г/л) (рН 3.5) для растворения осадков соединений железа; разведение учитывали при расчёте концентрации клеток.

Исследования ультраструктуры клеток проводили с помощью электронного микроскопа JEM-100 (JEOL). Для визуализации целых клеток использовали метод негативного окрашивания фосфо-вольфрамовой кислотой (Brenner, Horne, 1959). Образцы для ультратонких срезов были приготовлены с окрашиванием уранил ацетатом и цитратом свинца (Spurr, 1969; Bonch-Osmolovskaya et al., 1990).

Диапазоны температуры, рН и концентрации NaCl. Температурный диапазон роста микроорганизмов определяли в жидкой среде, используя набор термостатов, установленных на различные температуры. рН диапазон роста определяли при оптимальной температуре роста. Различные значения рН среды (от 3.0 до 10.0) создавали в пробирках

перед засевом путем добавления стерильных анаэробно приготовленных растворов 2М HCl или 5 % NaOH (вес/об.). pH измеряли при комнатной температуре с помощью pH-метра (pH 211, HANNA, ФРГ) или индикаторной тест-полоски (Merck, ФРГ). Для определения диапазона солености навески NaCl вносили в жидкую среду до стерилизации. Исследовали рост при концентрациях NaCl до 7.0% (вес/об.).

Использование доноров и акцепторов электронов. Растворимые субстраты и акцепторы электронов добавляли в пробирки из стерильных анаэробно приготовленных концентрированных растворов перед инокулированием. Нерастворимые субстраты и элементную серу добавляли в каждую пробирку перед стерилизацией. Для тестирования молекулярного водорода в качестве донора электронов, среду разливали в пробирки, заполняя газовую фазу смесью H₂/CO₂ в соотношении 80:20 (об.). Небольшие количества (до 10%) газообразных доноров или акцепторов электронов (H₂, CO, O₂, SO₂) добавляли в газовую фазу закрытых пробирок или флаконов стерильно шприцом.

Способность микроорганизмов к использованию различных субстратов определяли в среде, в которой тестируемый субстрат служил основным источником углерода и энергии. В качестве контроля всегда проверяли рост культуры на той же среде без добавления субстрата. Используемым считали субстрат, на котором конечная концентрация клеток, по меньшей мере, в три раза превышала рост в контроле.

Способность микроорганизмов использовать в качестве акцепторов Fe(III), Mn(IV), 9,10-антрахинон-2,6-дисульфат (АХДС) и O₂ тестировали в средах, не содержащих восстанавливающих агентов. Способность нитрата, нитрита, фумарата, элементной серы и ее соединений служить акцептором электронов проверяли как в среде, восстановленной 0.5 г/л Na₂S×9H₂O, так и в среде, не содержащей сульфида. В качестве контроля всегда проверяли рост культуры на той же среде без добавления акцептора. Об использовании потенциального акцептора электронов судили по увеличению конечной концентрации клеток по сравнению с контролем и по образованию продуктов восстановления. При восстановлении Fe(III)

коричнево-рыжий осадок превращался в черный осадок меньшего объема с магнитными свойствами. Восстановление и Mn(IV) сопровождалось изменением цвета и объема осадка. Восстановление АХДС и соединений серы качественно определяли по изменению цвета культуральной среды и/или образованию сульфида. Кроме того, проводили количественное определение продуктов восстановления акцепторов электронов (см. ниже Аналитические методы).

Все эксперименты проводили, как минимум, в двух повторностях в течение не менее трех последовательных пересевов.

Чувствительность к антибиотикам. Для определения чувствительности к антибиотикам среду, содержащую 100 мкг/мл антибиотика, инокулировали 10% (об.) тестируемой культуры и инкубировали при 50°C в течение двух недель.

Аналитические методы

Восстановление Fe(III) в культурах микроорганизмов определяли путем измерения образующегося Fe(II). Двухвалентное железо измеряли спектрофотометрически с 2,2'-дипиридилем (Резников и др., 1970) после 24-часовой экстракции образца объемом 0.5 мл в 5 мл 0.6 N HCl. Восстановление Mn(IV) определяли, измеряя количество образующегося Mn(II) фотометрическим методом с применением формальдоксима (Goto et al., 1962). Газообразные продукты метаболизма определяли с помощью газового хроматографа с колонкой HayeSep N 80/100 при 40°C и скорости потока 20 мл/мин (газ-носитель – аргон). Анализ короткоцепочечных органических кислот, спиртов, сахаров, глицерина проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с помощью ионного хроматографа Stayer (Aquilon, РФ) с рефрактометрическим детектором (Knauer, ФРГ) и колонкой Aminex HPLC-87H (Bio-Rad, США) с использованием в качестве подвижной фазы 5 mM H₂SO₄ со скоростью потока 0.6 мл/мин. Концентрации нитрата и сульфата определяли также методом HPLC на том же приборе с использованием колонки IonPack AS4-ASC (Dionex) и детектором по проводимости. Сульфид измеряли колориметрически с диметил-р-

фенилендиамином (Trüper & Schlegel, 1964). Для анализа продуктов восстановления нитрата использовали среду, не содержащую NH_4Cl . Нитрит определяли при помощи тест-полосок Nitrate-Test strips (MQuant™, Merck KGaA); аммоний определяли с реактивом Несслера или с фенол-гипохлоритом (Герхардт и др., 1983; Chaney & Marbach, 1962). Оксидазную и каталазную активности проверяли стандартными методами (Герхардт и др., 1983).

Хемотаксономическая характеристика

Клетки для хемотаксономического анализа выращивали в оптимальных условиях до поздней логарифмической- ранней стационарной фазы роста. Содержание клеточных жирных кислот (в форме производных сложного метилового эфира, полученных из 50 мг лиофилизированной биомассы) определяли методом газовой хроматографии-массовой спектрометрии (GC-MS). Содержание индивидуальной жирной кислоты рассчитывали, как процент от общего количества жирных кислот.

Для определения содержания Г+Ц нуклеотидных оснований, геномную ДНК из чистых культур выделяли методом Мармура (Marmur, 1961). Г+Ц состав определяли по температуре плавления ДНК (T_m) (Marmur & Doty, 1962) с ДНК *Escherichia coli* K-12 в качестве контроля, а также по результатам полногеномного секвенирования.

Денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ДГГЭ)

Выделение ДНК. Для выделения ДНК из чистых и накопительных культур клетки собирали центрифугированием при 12000 g в течение 10 мин. Клетки разрушали обработкой лизоцимом (1 мг/мл лизоцима в буфере, содержащем 1 mM ЭДТА, 100 mM Трис-НСl, (pH 8.0), 0.75 M сахарозы, 37°C, 30 мин) и протеиназой К (20 мг/мл протеиназы К, 55°C, 1.5-2 ч) в присутствии 0.5% додецилсульфата натрия. Полученные лизаты охлаждали до 0°C во льду и добавляли к ним раствор 5 M NaCl до конечной концентрации 1 M. ДНК из лизатов экстрагировали один раз смесью фенол-хлороформ (1:1) и дважды хлороформом и осаждали этанолом. Осадок растворяли в TE буфере (Маниатис и др., 1984), обрабатывали раствором

РНК-азы и пересаждали изопропиловым спиртом. Полученную ДНК растворяли в ТЕ буфере и использовали в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции (ПЦР).

ПЦР. Фрагменты генов 16S рРНК были получены путем прямой амплификации геномной ДНК. Использовали универсальный праймер Uni515F (Lane, 1991), содержащий CG-clamp на 5'-конце (Muyizer et al., 1993) в паре с *Bacteria*-специфичным праймером Bac-907R (Muyizer et al., 1995) или *Archaea*-специфичным праймером Arch-915R (Casamayor et al., 2000). Реакции амплификации проводили в смеси (конечный объем 40 мкл), содержащей 1-3 мкл раствора матричной ДНК, 4 мкл 10-кратного реакционного буфера, 1.0 мМ MgCl₂, 0.4 мкМ каждого праймера, 200 мкМ каждого трифосфата дезоксирибонуклеотида, 1.5 ед. активности *Taq* ДНК полимеразы. Реакции проводили согласно известному протоколу ПЦР амплификации для получения фрагментов ДНК для дальнейшего ДГГЭ анализа (Muyizer et al., 1993). Во всех экспериментах в качестве отрицательного контроля использовали реакцию без добавления ДНК. Амплификации проводили на многоканальном амплификаторе ДНК Терцик (ДНК-Технология, Россия). Продукты амплификации (5 мкл) анализировали электрофорезом в агарозном геле (1.5-2.0% (вес/об.)) в Трис-ацетат-ЭДТА буфере (Маниатис и др., 1984). Для визуализации сигналов в прокрашенном бромистым этидием (0.5 мкг/мл) геле использовали УФ-трансиллюминатор (длина волны 320 нм).

ДГГЭ. Полученные продукты амплификации (длиной около 400 п.н.) разделяли с помощью ДГГЭ, проводимому согласно протоколу (Muyizer et al., 1997), на установке Scie-Plas DGGE (Scie-Plas Ltd., Англия). Продукты ПЦР наносили на 8% полиакриламидный гель с денатурирующим градиентом от 35% до 65%, (где 100% денатурант содержал 7М мочевины и 40% формамид). Электрофорез проводили в 0.5xTE буфере при 60°C, сначала 10 мин при 20В, затем в течение 18 часов при 70В. После окончания электрофореза гель прокрашивали 45 мин красителем нуклеиновых кислот SYBR Gold (1:10,000 dilution; Molecular probes, США) и промывали дистиллированной водой. Для визуализации сигналов в геле использовали УФ-трансиллюминатор (длина волны 320 нм).

Секвенирование ДГГЭ-фрагментов. Фрагменты ДНК из индивидуальных полос, полученных в ходе ДГГЭ, были перенесены с помощью стерильного наконечника для автоматической пипетки в стерильную пробирку, содержащую 20 мкл стерильной воды. Пассивная диффузия ДНК из геля в воду проходила в течение ночи при 4°C. 10 мкл элюата использовали затем в качестве матрицы для ПЦР с парами праймеров Uni-517F- Bac-907R или Uni-517F- Arch-915R. Реамплификацию фрагментов ДНК проводили по следующей программе: денатурация ДНК при 92°C в течение 2 мин; 30 циклов, состоящих из денатурации (92°C, 40 с), отжига праймеров (53°C, 50 с) и элонгации (72°C, 50 с); и заключительная элонгация при 72°C в течение 5 мин. Полученные продукты ПЦР очищали при помощи набора реактивов Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega, США), согласно инструкциям производителя. Нуклеотидные последовательности продуктов амплификации определяли методом ферментативного секвенирования на автоматическом секвенаторе DNA Sequencer 373A или ABI PRISM 3730 Sequencer (Applied Biosystems, США), используя стандартные протоколы и наборы реактивов. Сравнение нуклеотидных последовательностей с последовательностями генов 16S рРНК, содержащимися базе данных GenBank NCBI (Benson et al., 1999) проводили при помощи программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Altschul et al., 1990).

Филогенетический анализ

Для филогенетического анализа чистых культур выделяли геномную ДНК как описано выше и избирательно амплифицировали ген 16S рРНК с помощью ПЦР с универсальной парой праймеров 27F-1429R (Lane, 1991). Реакции амплификации проводили в смеси (конечный объем 50 мкл), содержащей 50-100 нг матричной ДНК, 5 пмоль каждого праймера, 12.5 нмоль каждого трифосфата дезоксирибонуклеотида, 3.0 ед. активности *Taq* ДНК полимеразы в 5 мкл 10-кратного реакционного буфера. ПЦР проводили по следующей программе: денатурация ДНК при 94°C в течение 9 мин; 30 циклов, состоящих из денатурации (94°C, 60 с), отжига праймеров (55°C, 60 с) и элонгации (72°C, 60 с); и заключительная элонгация при 72°C в течение 7 мин. Полученные продукты ПЦР очищали при помощи набора реактивов

Wizard PCR Preps kit (Promega, США), согласно инструкциям производителя. Ген 16S рPHК был секвенирован в обоих направлениях с использованием праймеров 27F, 357F, 530F, 1114F, 342R, 519R и 1492R (Lane, 1991) на автоматическом секвенаторе (см.выше). Нуклеотидную последовательность гена собирали из полученных фрагментов длиной 500-800 п.н. с помощью программы BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Сравнение нуклеотидных последовательностей генов 16S рPHК выделенных чистых культур с последовательностями генов 16S рPHК, содержащимися базе данных GenBank NCBI (Benson et al., 1999) проводили при помощи программ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Altschul et al., 1990) или EzTaxon-e server (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>, Chun et al., 2007; Kim et al., 2012; Yoon et al., 2017). Выравнивание последовательностей генов 16S рPHК выбранных родственных микроорганизмов проводили с помощью программ CLUSTAL W или MUSCLE, входящих в пакет программ для филогенетического анализа MEGA (Tamura et al., 2007; 2011; 2013). Этот же пакет программ использовали для построения филогенетических деревьев.

Анализ геномов

Анализ полноразмерных геномов проводили при помощи он-лайн сервисов RAST (<http://rast.theseed.org>) и IMG/M (<https://img.jgi.doe.gov>). Предполагаемые цитохромы с идентифицировали по наличию Cys-Хаа-Хаа-Cys-His пептидных последовательностей. Белки проверяли на наличие трансмембранных спиралей с помощью TMHMMServer v. 2.01 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). N-концевые сигнальные пептиды определяли при помощи он-лайн сервисов Signal Pv.4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) для грамотрицательных бактерий и PRED-TAT (<http://www.compgen.org/tools/PRED-TAT/>).

Оценка распространения новых микроорганизмов

Оценку географического распространения новых таксонов микроорганизмов проводили, используя базу данных GenBank и алгоритм BLASTn. Организмы, в том числе некультивируемые, имеющие сходство генов 16SpPHК не менее 95%, считались относящимися к одному роду (Tindall et al., 2010; Yarza et al., 2014). В анализ были включены последовательности генов 16SpPHК, длиной не менее 1400 пар нуклеотидов.

ГЛАВА 4. НОВЫЕ ТЕРМОФИЛЬНЫЕ ПРОКАРИОТЫ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ АЗОТА В ЭНЕРГЕТИЧЕСКОМ МЕТАБОЛИЗМЕ

Восстановление соединений азота могло играть одну из главных ролей и в экосистемах ранней Земли. Предполагается, что оксид азота (NO), присутствовавший в значительных количествах в древней атмосфере, а также его производные, нитрит и нитрат, выполняли функцию наиболее сильного окислителя, аналогично кислороду в современной биосфере (Castresana & Saraste, 1995; Ducluzeau et al., 2009). В современной биосфере нитратвосстанавливающие прокариоты обеспечивают функционирование восстановительной части цикла азота. В данной работе исследовали две метаболические группы термофильных нитратредукторов: органотрофные микроорганизмы, использующие в качестве донора электронов для восстановления нитрата органические соединения, и литотрофные нитратредукторы, окисляющие соединения серы в анаэробных условиях.

4.1. Органотрофные нитратвосстанавливающие микроорганизмы

4.1.1. Выделение и характеристика новых таксонов органотрофных нитратредукторов

Три штамма термофильных органотрофных нитратвосстанавливающих бактерий, источника были выделены, описаны и узаконены как новые таксоны (Таблица 6).

Таблица 6. Таксономическое положение и местообитания новых органотрофных нитратвосстанавливающих бактерий

Организм, статус	Таксономическое положение*	Местообитание, описание образца
<i>Tepidibacillus fermentans</i> gen. nov. sp. nov.	<i>Firmicutes - Bacilli - Bacillales</i>	Северо-Ставропольское подземное газохранилище (Россия). Пластовая вода и осадок
<i>Thermogutta hypogea</i> gen. nov. sp. nov.	<i>Planctomycetes-Planctomycetacia-Planctomycetales-Planctomycetaceae</i>	Золотодобывающая шахта Беатрикс (ЮАР) (глубина 1375 м). Трещинная вода
<i>Thermostilla marina</i> gen. nov. sp. nov.	<i>Planctomycetes-Planctomycetacia-Planctomycetales-Planctomycetaceae</i>	Морская мелководная гидротерма (глубина 0.5 м), о. Вулкано (Италия). Горячая вода с песком из гидротермального выхода.

*List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature .(<http://www.bacterio.net>)

Tepidibacillus fermentans STGH^T gen. nov., sp. nov.

Штамм STGH^T был выделен из образца пластовой воды, отобранной из наблюдательной скважины Северо-Ставропольского подземного газохранилища. Это крупнейшее в мире подземное хранилище газа создано на основе Северо-Ставропольского газового месторождения. Пласты-коллекторы представлены, в основном, алевритами, алевритами и глинистыми разностями. Среди минералов, слагающих породы, широко распространен глауконит (Тарасов и др., 2011). Глубина залегания пластов в среднем 800–1000 м, температура в пластах колеблется в зависимости от режима работы хранилища от 30 до 50°C. Полностью заполненные пластовой водой стеклянные пробирки закрывали резиновыми пробками и завинчивающимися крышками и хранили при +4°C до начала работы.

Колонии и морфология клеток. В агаризованной среде сферические бежевые колонии примерно 1.0 мм в диаметре, появлялись в толще агаровых столбиков через 3 суток инкубации при 50°C. Клетки штамма STGH^T представляли собой прямые палочки, 0.3 мкм толщиной и 2.0-4.0 мкм длиной (Рисунок 4а,б), подвижные за счёт одного неполярного жгутика. Клетки штамма STGH^T образовывали округлые светопреломляющие эндоспоры, располагающиеся в раздутом терминальном спорангии. Споры являлись термоустойчивыми и были способны прорасти после кипячения в течение двух часов или автоклавирования культуры при 1 ати (121°C) в течение 30 минут. Ультратонкие срезы штамма STGH^T показали наличие типичного для грамположительных бактерий отчётливого пептидогликанового слоя в клеточной стенке (Рисунок 4с).

Физиологические характеристики. Температурный диапазон для роста штамма STGH^T составлял 36-65°C, с оптимумом при 50-52°C. Роста не наблюдалось при 68°C и выше или при температурах 32°C и ниже после трёх недель инкубации. Штамм STGH^T рос в диапазоне pH от 5.5 до 8.0, с оптимумом при pH 7.0-7.5. При pH 5.0 и ниже или pH

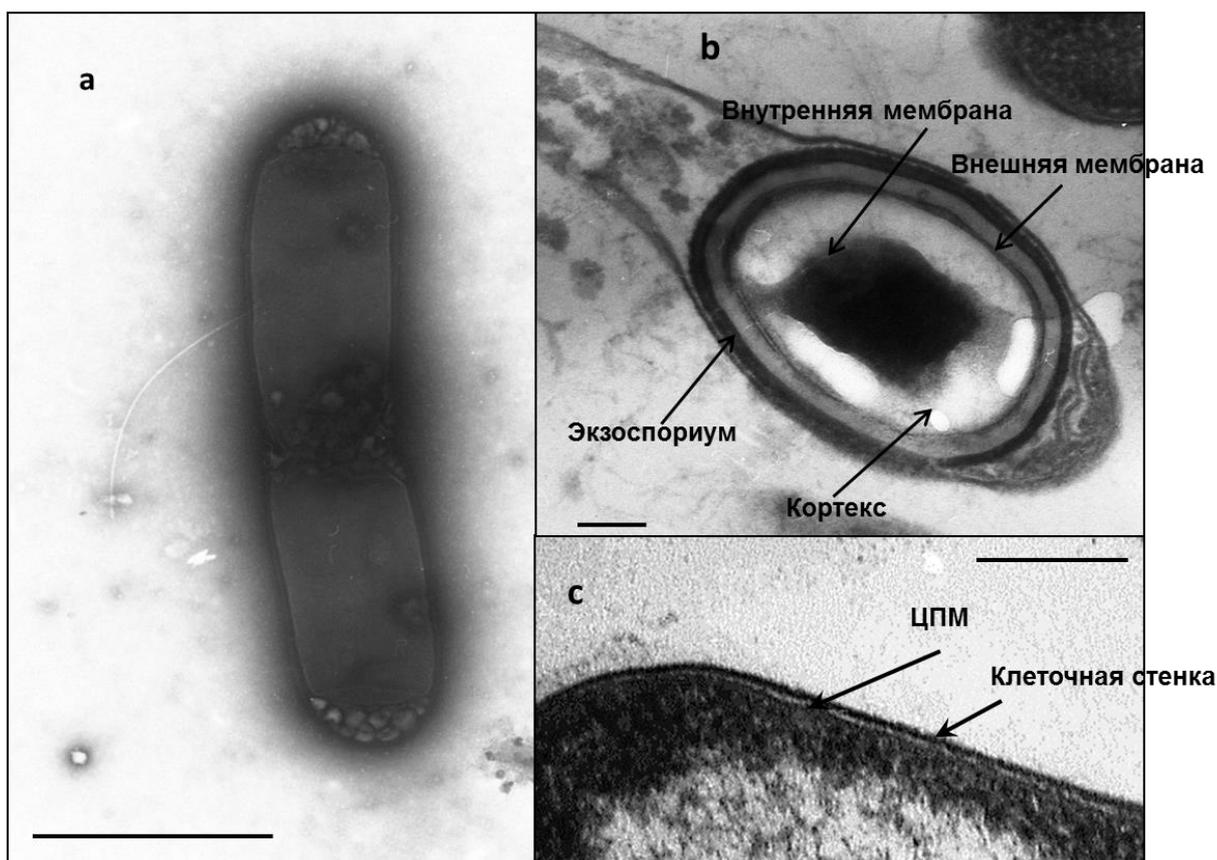


Рисунок 4. (а) Электронная микрография негативно окрашенных клеток штамма *Terpidibacillus fermentans* STGH^T, показывающая морфологию клетки и положение жгутика, масштабная линейка, 0.5 мкм. Ультратонкий срез, показывающий образование эндоспоры (b) и строение клеточной стенки (с), масштабная линейка, 0.1 мкм. ЦПМ цитоплазматическая мембрана

8.5 и выше роста отмечено не было. Рост штамма STGH^T наблюдался при концентрации NaCl в среде от 0 до 4.0% (вес/об.), с оптимумом при 1.0 % (вес/об.); рост отсутствовал при 5.0% NaCl и выше.

Дрожжевой экстракт не был обязательным для роста, но добавление как минимум 0.05 мг/л значительно стимулировало рост. Потенциальные акцепторы электронов проверяли с дрожжевым экстрактом (2,0 г/л) в качестве донора. Нитрат (10 мМ), АХДС, тиосульфат (20 мМ каждого) и элементная сера (10 г/л) использовались для роста. Сульфат (14 мМ), фумарат (20 мМ), нитрит (2.5 мМ), Mn(IV) (25 ммоль/л MnO₂), ферригидрит (90 ммоль Fe(III)/л) и цитрат Fe(III) (10 мМ) не восстанавливались и не поддерживали рост. Нитрат восстанавливался в нитрит, тиосульфат и сера – в сульфид. Штамм STGH^T не рос при

атмосферной концентрации кислорода, однако мог расти микроаэробно (оптимальная концентрация O₂ в газовой фазе 5-10% (об.)).

Доноры электронов, используемые для роста в присутствии 0.05 г/л дрожжевого экстракта и нитрата (10мМ) или кислорода (7% (об.) в газовой фазе) в качестве акцепторов, включали пептон, триптон, дрожжевой экстракт, глюкозу, фруктозу, мальтозу (2.0 г/л каждого), фумарат, лактат, малат, пируват и сукцинат (10 мМ каждого). Штамм также мог расти в отсутствие добавленных акцепторов электронов за счет брожения на глюкозе, фруктозе, мальтозе и пирувате. Конечными продуктами брожения с глюкозой были сукцинат, лактат, ацетат и CO₂; водород в ходе брожения не образовывался. Из 1 мМ потребленной глюкозы образовывалось 0.6 мМ сукцината, 0.6 мМ лактата и 0.3 мМ ацетата. Изолят не рос с ацетатом (10 мМ), формиатом, пропионатом, бутиратом, метанолом, этанолом, глицерином (20 мМ каждого), цитратом (10 мМ), сахарозой, ксилозой, целлобиозой, арабинозой, лактозой, галактозой, крахмалом и карбоксиметил-целлюлозой (2.0 г/л каждого) независимо от наличия акцептора электронов. Время удвоения в оптимальных условиях при росте с дрожжевым экстрактом и нитратом было 40 мин. Время удвоения в процессе брожения или в микроаэробных условиях составляло 1.2 ч. Изолят имел отрицательный результат в тесте на каталазную активность и положительный в тесте на активность оксидазы.

Хемотаксономический анализ. В состав жирных кислот входили прямоцепочечные и разветвленные насыщенные кислоты. Основными жирными кислотами были C_{16:0}, iso-C_{16:0}, anteiso-C_{15:0}, iso-C_{15:0} и iso-C_{14:0} (33.0, 19.6, 17.1, 10.6 и 7.8%, соответственно). Другие жирные кислоты присутствовали в минорных или следовых количествах (менее 5% общего содержания жирных кислот). Доминирующим дыхательным липохиноном был менахион МК-7. Главными полярными липидами были фосфатидинглицерин, фосфатидилэтанамин, фосфатидилсерин и два неустановленных фосфолипида. Содержание G+C в геномной ДНК штамма STGH^T – 34.8 мол% (T_m).

Филогенетический анализ. Сравнение 1589 пар нуклеотидов последовательности гена 16S рРНК штамма STGH^T с базами данных GenBank и EzTaxon-e показало, что он относится к классу *Bacilli* (Рисунок 5). С помощью программы MUSCLE (MEGA 5.0) удалось выявить несколько коротких вставок в молекуле 16S рРНК, которые были исключены из филогенетического анализа. Почти полноразмерная последовательность гена (1512 п.н.) имела наибольшее сходство с *Vulcanibacillus modesticaldus* (94.24 %). Сходство гена 16S рРНК штамма STGH^T с другими валидированными представителями класса *Bacilli* не превышало 92%.

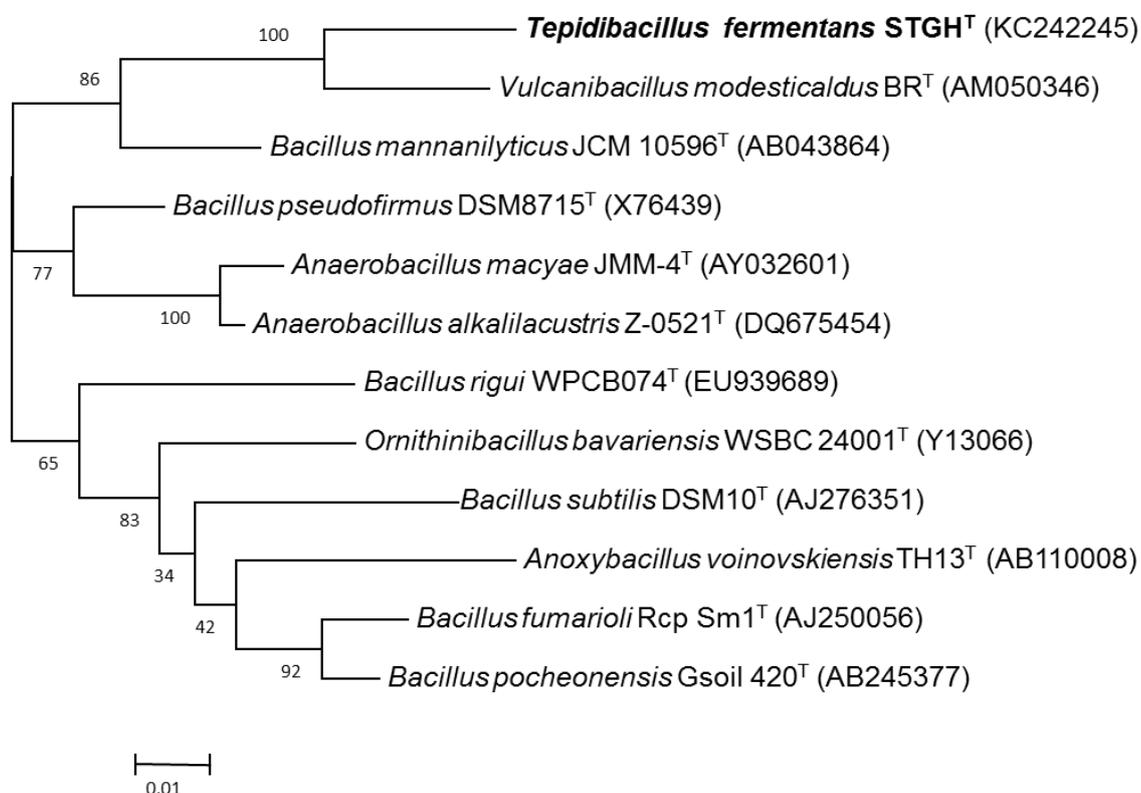


Рисунок 5. Дендрограмма, основанная на последовательности гена 16S рРНК, показывающая филогенетическое положение *Tepidibacillus fermentans* STGH^T, масштабная линейка – 1% различия последовательностей

Новый умеренно-термофильный микроорганизм был выделен из подземного газохранилища. Характеристики роста (температура, pH, соленость) соответствуют параметрам его местообитания и подтверждают автохтонную природу нового изолята.

Полученный штамм имеет низкое филогенетическое сходство даже с наиболее близким организмом. Помимо этого, физиологические характеристики явно отличают штамм STGH^T от *Vulcanibacillus modesticaldus* (Таблица 7). Оба организма представляют собой умеренно-термофильные анаэробные спорообразующие палочки, способные восстанавливать нитрат. Однако, в отличие от *V. modesticaldus*, штамм STGH^T может использовать и другие неорганические акцепторы электронов. Штамм STGH^T может расти в микроаэробных условиях (до 10% O₂), тогда как *V. modesticaldus* - строгий анаэроб. Способность к микроаэрофилии среди анаэробных представителей *Bacilli* была показана только для *Microaerobacter hydrothermalis* (Khelifi et al. 2010). Еще одним существенным различием является способность STGH^T к брожению, одним из основных продуктов которого является необычный для этого процесса сукцинат.

Штамм STGH^T вместе с *V. modesticaldus* образуют отдельный кластер на дендрограмме, что не позволяет отнести их ни к одному из имеющихся семейств этого класса. На основании физиологических и генотипических свойств и филогенетического анализа мы предложили отнести штамм STGH^T к новому роду *Tepidibacillus* с типовым видом *Tepidibacillus fermentans*.

Типовой и единственный штамм STGH^T депонирован в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) под номером DSM 23802^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером VKM B-2671^T.

Таблица 7. Дифференцирующие характеристики штамма *Tepidibacillus fermentans* STGH^T и ближайшего филогенетически родственного микроорганизма *Vulcanibacillus modesticaldus* BR^T

Характеристика	<i>Tepidibacillus fermentans</i> STGH ^T	<i>Vulcanibacillus modesticaldus</i> BR ^T
Источник выделения	Подземное газохранилище	Глубоководная гидротерма
Подвижность	+	-
Температура, °С мин-(опт)-макс	36–(50–52)–65	37–(55)–60
NaCl (%) мин-(опт)-макс	0–(1)–4	1–(2–3)–4
Акцептор электронов:		
Тиосульфат	+	-
Элементная сера	+	-
АХДС	+	-
Микроаэробный рост	+	-
Брожение	+	-

***Thermogutta terrifontis* R1^T gen. nov., sp. nov. и *Thermogutta hypogea* SBP2^T sp. nov.**

Два новых штамма термофильных планктомицетов были получены из наземного и подземного местообитаний. Штамм R1^T был выделен из пробы воды и микробного мата (рН 7.3, 46°C), отобранной в августе 2012 года из горячего источника на о. Кунашир (Курильские острова, Россия). Штамм SBP2^T был выделен из пробы трещинной воды (рН 8.8, 32°C), отобранной в действующей золотодобывающей шахте Беатрикс (SibanyeGold, Фри-Стейт, ЮАР) на глубине 1375 м в декабре 2011 года. Образцы отбирали в стерильные флаконы, заполненные азотом и хранили при +4°C.

Морфология клеток. Клетки обоих изолятов обладали сходной морфологией и представляли собой эллипсоиды 1.0-1.5 мкм диаметром (Рисунок 6). Клетки делились почкованием. Молодые культуры содержали очень подвижные клетки меньшего размера (0.5-0.8 мкм) с одним довольно толстым полярным жгутиком, очевидно, отпочковавшиеся от материнской клетки. Со временем эти клетки теряли подвижность и трансформировались в более крупные, встречающиеся по-отдельности, в парах или формировавшие большие бесформенные агрегаты. Изучение ультратонких срезов выявило наличие внутрицитоплазматической и внешней мембран, и заметный нуклеоид (Рисунок 7). Такой тип внутренней организации клетки характерен для планктомицетов, сходных с *Pirellula* ((Fuerst, 2005; Fuerst & Sagulenko, 2011).

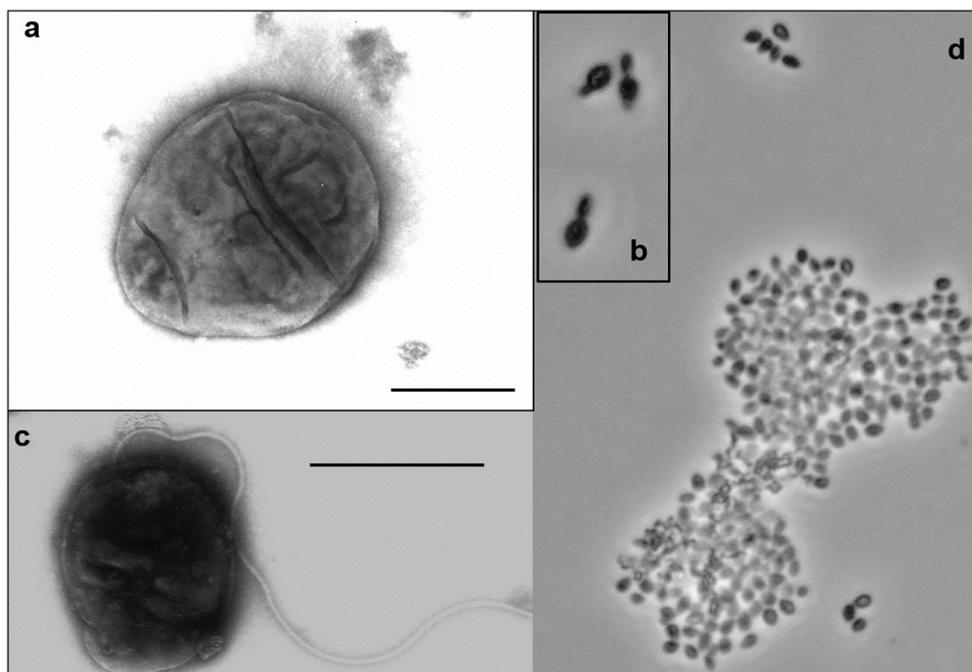


Рисунок 6. Морфология клеток *Thermogutta hypogea* SBP2^T. Электронная микрография негативно окрашенных клеток штамма SBP2^T, показывающая морфологию (а) зрелой и (с) дочерней клетки, масштабная линейка, 0.5 мкм; фазово-контрастная микроскопия, показывающая (b) почкующиеся клетки и (d) агрегаты клеток

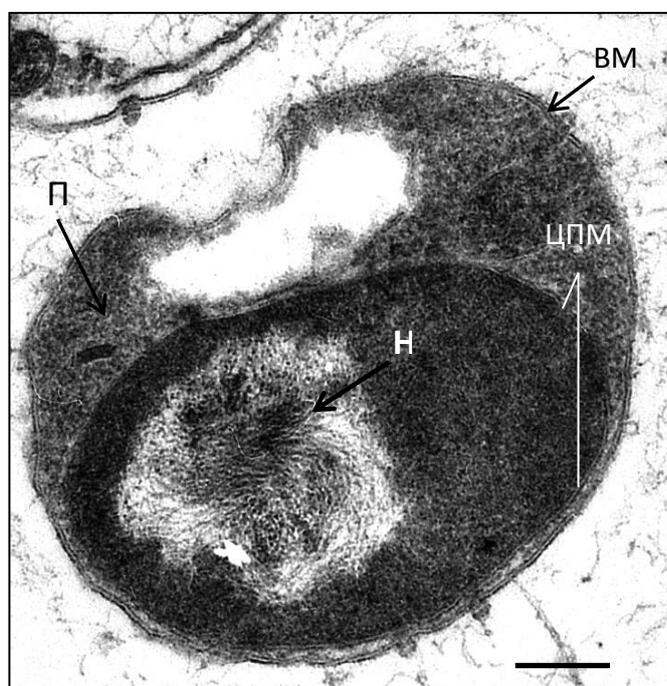


Рисунок 7. Ультратонкий срез клетки *Thermogutta hypogea* SBP2^T, показывающий нуклеоид (Н), цитоплазматическую мембрану (ЦПМ), периплазму (П), внешнюю мембрану (ВМ); масштабная линейка, 0.1 мкм

Физиологические характеристики. Штамм R1^T рос при температурах 25-67°C с оптимумом при 55-60°C. Роста не наблюдалось при 70°C и выше в течение 3х недель инкубации. Диапазон pH составлял 4.0-8.0 с оптимумом при pH 6.0-6.5. Роста не было при pH 3.5 и ниже и 9.0 и выше. Температурный диапазон роста штамма SBP2^T составлял 30-60°C с оптимумом при 52°C. Роста не наблюдалось при 65°C и выше и при 28°C и ниже в течение 3х недель инкубации. Диапазон pH составлял 5.0-9.0 с оптимумом при pH 7.5-8.0. Роста не было при pH 4.5 и ниже и 9.5 и выше. NaCl не требовался для роста изолятов, и оптимум роста наблюдался в его отсутствие, однако они могли расти при концентрации NaCl до 2.5% (вес/об.). При концентрации NaCl 3.0% (вес/об.) и выше роста обоих штаммов не наблюдалось.

Изоляты росли в анаэробных условиях с углеводами в качестве доноров электронов и нитрате (10 мМ) или нитрите (2,0 мМ) в качестве акцепторов. Дрожжевой экстракт не был необходим для роста. Добавление его (не менее 0.05 мг/л) стимулировало рост штамма R1^T и не влияло на рост SBP2^T. Субстраты, поддерживающие рост изолятов, приведены в Таблице 10. Рост с нитратом в качестве акцептора электронов сопровождался образованием нитрита и аммония. В процессе роста с нитритом (2.0 мМ), 1.9 мМ аммония накапливалось в среде. В дополнение к нитрату и нитриту, штамм SBP2^T в ходе роста мог восстанавливать элементарную серу (10 г/л) с образованием сульфида (2.5-3.0 мМ). Сульфат (14 мМ), сульфит (5 мМ), тиосульфат, фумарат (20 мМ каждого), ферригидрит (90 ммоль Fe(III)/л) и цитрат Fe(III) (10 мМ) не восстанавливались и не поддерживали рост ни одного их выделенных штаммов. Оба изолята могли расти микроаэробно (до 10% O₂ в газовой фазе), а также без добавленного акцептора электронов, за счет брожения (Таблица 8). Конечными продуктами сбраживания глюкозы были молекулярный водород, ацетат и лактат. Водород не детектировался при росте в присутствии нитрата. Образование водорода отмечалось в ходе роста при низких концентрациях O₂ и прекращалось при концентрациях кислорода в газовой фазе 5% (об.) и выше.

Таблица 8. Использование субстратов *Thermogutta terrifontis* R1^T и *T. hypogea* SBP2^T

Субстрат	Концентрация	Рост с нитратом		Рост при брожении	
		R1 ^T	SBP2 ^T	R1 ^T	SBP2 ^T
Глюкоза, трегалоза, сахароза, крахмал, ксантановая камедь	2 г/л	+	+	+	+
Целлобиоза, ксилан	2 г/л	+	+	+	-
Галактоза, пектин	2 г/л	+	+	-	+
Манноза, ксилоза	2 г/л	+	+	-	-
Агароза, фруктоза, лактоза	2 г/л	-	+	-	+
Арабиноза, мальтоза	2 г/л	-	+	-	-
Альгинат, целлюлоза, хитин, инулин	2 г/л	-	-	-	-
Пептон, дрожжевой экстракт	2 г/л	-	-	-	-
Ацетат, формиат, пропионат, бутират	20 мМ	-	-	-	-
Метанол, этанол, пропанол, изо-пропанол, глицерин	20 мМ	-	-	-	-
Маннит, сорбит	2 г/л	-	-	-	-
Лактат	10 мМ	-	+	-	-
Цитрат, фумарат, пируват, малат, сукцинат	10 мМ	-	-	-	-

Результаты тестов на оксидазную реакцию были негативными у обоих штаммов, кроме того, штамм SBP2^T имел отрицательный, а штамм R1^T положительный результат в тестах на активность каталазы.

Оба штамма были устойчивы к пеницилину, ампицилину (200 мкг/мл каждого) и ванкомицину (100 мкг/мл), но чувствительны к стрептомицину, канамицину и хлорамфениколу (100 мкг/мл каждого).

Хемотаксономический анализ. В состав жирных кислот обоих штаммов входили прямоцепочечные насыщенные кислоты, включая длинноцепочечные (19 и 20 атомов углерода). Кроме того, у штамма R1^T были обнаружены разветвленные жирные кислоты.

Ненасыщенные и гидроксид-кислоты обнаружены не были. Основными жирными кислотами у обоих штаммов были C_{16:0}, C_{18:0} и C_{20:0}. Штамм SBP2^T содержал также значительные количества C_{19:0}, а штамм R1^T - iso-C_{19:0}. Содержание Г+Ц в геномной ДНК штаммов R1^T и SBP2^T – 57.3 и 66.6 мол% (T_m), соответственно.

Филогенетический анализ. Сравнение почти полноразмерных последовательностей генов 16S рРНК штаммов R1^T и SBP2^T с базой данных GenBank выявило, что они относятся к порядку *Planctomycetales* (Рисунок 8) с наиболее высоким сходством (95.6 и 98.7%, соответственно) с '*Thermopirellula anaerolimosa*' VM20-7. Сходство генов 16S рРНК выделенных штаммов между собой составило 96.7%. Среди валидно-описанных видов наиболее близкородственным оказался штамм *Blastopirellula marina* DSM 3645^T (87% сходства генов 16S рРНК).

Полученные изоляты являются термофильными (температурный оптимум роста выше 50°C), факультативно анаэробными и микроаэрофильными организмами. К моменту проведения данной работы было известно всего о двух планктомицетах, способных расти при температурах 40-50°C: *Isosphaera pallida* и '*Thermopirellula anaerolimosa*' VM20-7, выделенных из горячего источника в Орегоне, США и из очистных сооружений в Японии (Giovannoni et al., 1987, Liu et al., 2012b). Однако, *I. pallida* может расти лишь до 52°C и имеет оптимум роста при 41°C, а '*T. anaerolimosa*' имеет верхнюю границу роста 50°C и оптимум при 45°C. В отличие от них, новые изоляты растут до 65-67°C с оптимумом при 52-60°C, и таким образом являются первыми истинными термофильными представителями филума *Planctomycetes*. Оба штамма могут осуществлять различные катаболические процессы, такие как брожение, аэробное и анаэробное дыхание.

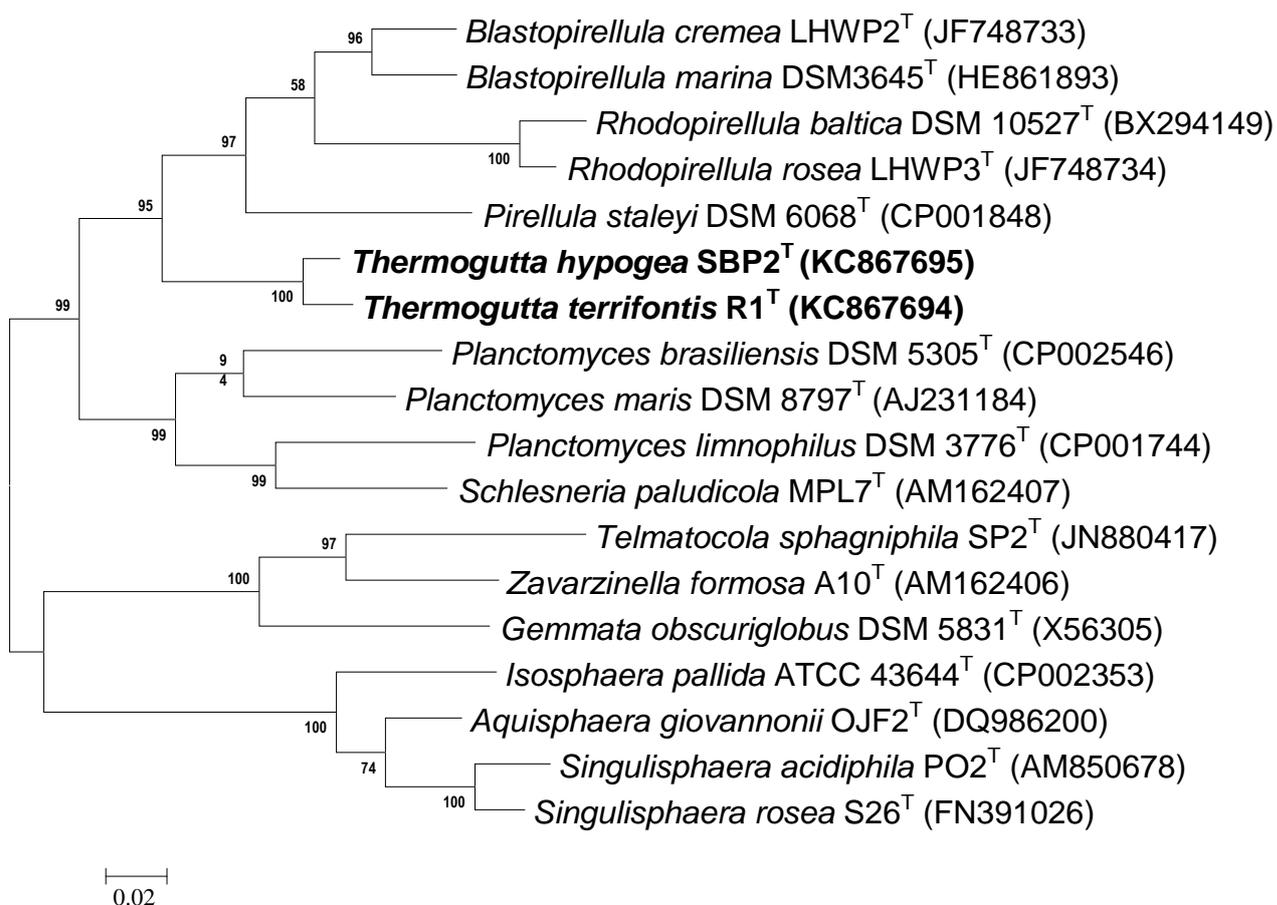


Рисунок 8. Дендрограмма, основанная на последовательности гена 16S рPHК, показывающая филогенетическое положение *Thermogutta terrifontis* R1^T и *Thermogutta hypogea* SBP2^T, масштабная линейка – 2% различия последовательностей

Уровень сходства между двумя новыми изолятами ниже 97%, что позволяет отнести их к разным видам одного рода. Этот род имеет низкий уровень сходства (менее 87%) генов 16S рРНК с валидно-описанными видами филума *Planctomycetes* и с высоким бутстреп-значением (95) занимает отдельную ветвь на дендрограмме, что определенно указывает на его самостоятельное положение.

На основании филогенетического положения и фенотипических и физиологических свойств мы предложили отнести два новых изолята к двум новым видам одного рода. Поскольку близкородственный род '*Thermopirellula*' формально не описан и не валидирован, мы предложили считать штамм R1^T типовым штаммом типового вида нового рода, *Thermogutta terrifontis* gen. nov., sp. nov. Мы также предложили отнести штамм SBP2^T к роду *Thermogutta* как типовой штамм второго вида, *Thermogutta hypogea* sp. nov.

Типовой и единственный штамм *Thermogutta terrifontis* R1^T депонирован в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) под номером DSM 26237^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером VKM В-2805^T.

Типовой и единственный штамм *T.hypogea* SBP2^T депонирован в Японской коллекции микроорганизмов (Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center) под номером JCM 19991^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером VKM В-2782^T.

***Thermostilla marina* SVX8^T gen. nov., sp. nov.**

Штамм SVX8^T был выделен из пробы песка, гидротермального флюида и морской воды, отобранной из мелководной морской гидротермы (70°C, pH 6.5-7.0), расположенной на глубине 0.5 м и на расстоянии 3 м от берега на о. Вулкано, Италия. Образцы были отобраны анаэробно в плотно закрытые флаконы и хранились при +4°C до начала работы.

Морфология клеток. Клетки нового изолята представляли собой эллипсоиды 0.5-1.2 мкм диаметром (Рисунок 9). Клетки делились почкованием. В культуре встречались одиночные клетки, пары, короткие цепочки из 4-5 клеток большие бесформенные агрегаты. Подвижные клетки имели один довольно толстый полярный жгутик. Ультратонкие срезы штамма выявили грамтрицательный тип клеточной стенки. Большую часть цитоплазмы клетки и занимал заметный нуклеоид (Рисунок 10).

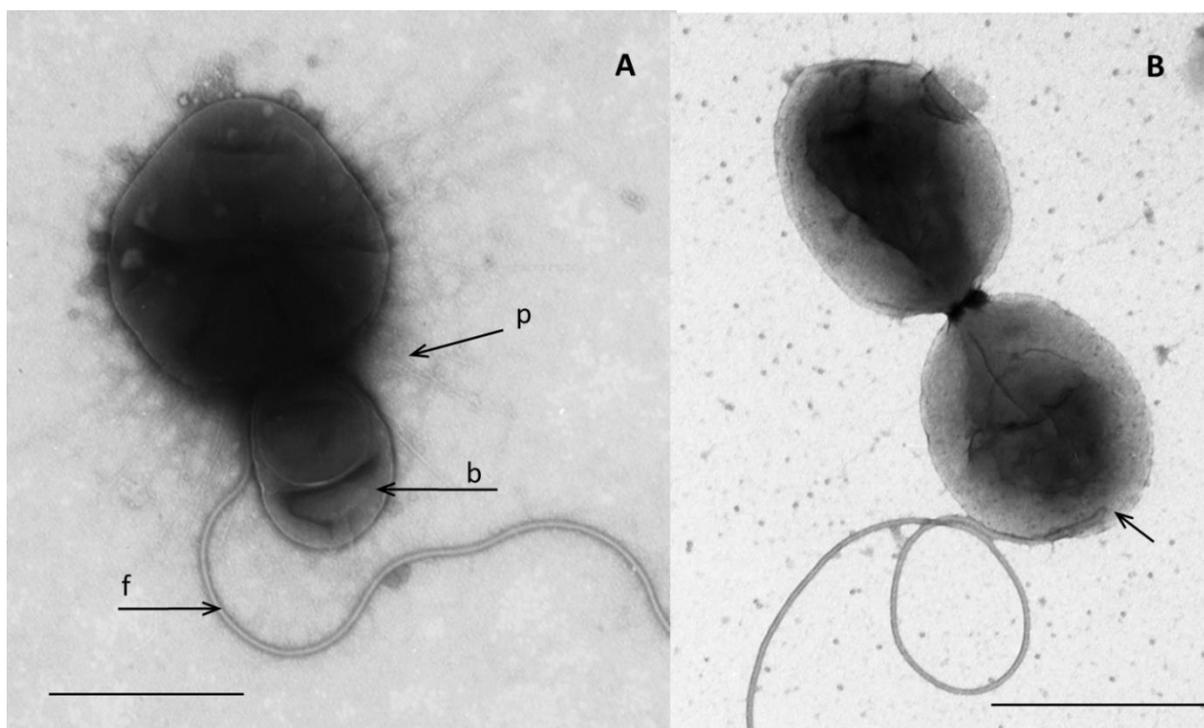


Рисунок 9. Электронная микрография негативно окрашенных клеток *Thermoestilla marina* SVX8^T, показывающая морфологию почкующихся клеток. (A) Материнская клетка с пилиями (щетинками) (p) и отпочковывающаяся клетка (b) со жгутиком (f). (B) Дочерняя клетка, выросшая до размеров материнской, стрелкой показано полярное положение жгутика у дочерней клетки; масштабная линейка, 0.5 мкм.

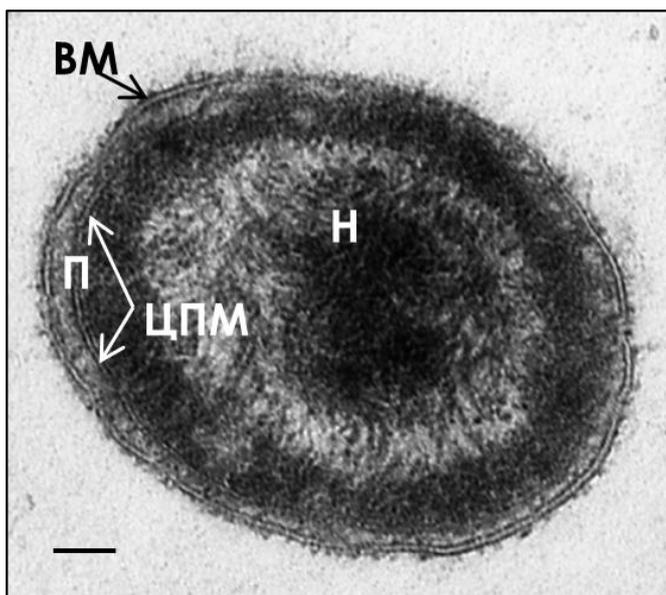


Рисунок 10. Ультратонкий срез клетки *Thermotilla marina* SVX8^T, показывающий нуклеоид (Н), цитоплазматическую мембрану (ЦПМ), периплазму (П), внешнюю мембрану (ВМ); масштабная линейка, 0.1 мкм

Физиологические характеристики. Штамм SVX8^T рос в диапазоне температур 30-68°C с оптимумом при 55°C. Роста не наблюдалось при 70°C и выше и при 28°C и ниже в течение 3х недель инкубации. Диапазон pH составлял 5.0-9.0 с оптимумом при pH 7.0-8.0. Роста не было при pH 4.5 и ниже и 9.5 и выше. Штамм рос при концентрации NaCl от 0.8 до 4.5% (вес/об.) с оптимумом при 2.5-3.5%, и не рос при концентрации NaCl 0.5% (вес/об.) и ниже или при 5.0% NaCl (вес/об.) и выше.

В отсутствие внешних акцепторов электронов штамм SVX8^T рос, сбраживая глюкозу, целлобиозу, мальтозу, сахарозу, трегалозу, пектин, ксантановую камедь или ксилан (2.0 г/л каждого). Конечными продуктами брожения с глюкозой или мальтозой были молекулярный водород, ацетат, лактат и CO₂. Конечная концентрация клеток была в диапазоне 5x10⁶ кл./мл. Добавление нитрата (10 мМ) увеличивало конечную концентрацию клеток на два порядка, до 8x10⁸ кл./мл. Дрожжевой экстракт не был необходим для роста штамма, но стимулировал его. В присутствии 0.1 г/л дрожжевого экстракта и нитрата (10 мМ) как акцептора электронов штамм использовал арабинозу, глюкозу, целлобиозу, мальтозу, сахарозу, трегалозу, агарозу, альгинат, пектин, крахмал, ксантановую камедь, ксилан (2.0 г/л каждого)

или пируват (10 мМ). Фруктоза, галактоза, лактоза, манноза, ксилоза, целлюлоза, хитин, инулин, маннит, сорбит, пептон, дрожжевой экстракт (2.0 г/л каждого), водород (H₂/CO₂ 80/20 (об.)), ацетат, формиат, метанол, этанол, глицерин, лактат, малат или сукцинат (10 мМ каждого) не поддерживали рост. Нитрат восстанавливался в нитрит, образования аммония или молекулярного азота не детектировалось. В дополнение к нитрату, изолят мог расти с элементарной серой (10 г/л) в качестве акцептора электронов, восстанавливая ее в сульфид (5.5-6.0 мМ). Конечная концентрация клеток в этом случае была 1x10⁸ кл./мл. Сульфат (14 мМ), сульфит (5 мМ), тиосульфат (15 мМ), нитрит (2.5 и 1.0 мМ) или ферригидрит (90 ммоль Fe(III)/л) не восстанавливались и не поддерживали рост с мальтозой в присутствии 0.1 г/л дрожжевого экстракта. Штамм SVX8^T не рос литоавтотрофно с водородом в качестве донора электронов и нитратом или серой в качестве акцептора, а также не рос за счет анаэробного окисления серы нитратом. Штамм не рос в аэробных условиях, но рос микроаэробно (до 2% O₂ в газовой фазе). Рост сопровождался потреблением кислорода с 2% до менее 0.01% O₂ в газовой фазе. При концентрации кислорода в газовой фазе 3% и выше роста не наблюдалось. Изолят имел отрицательный результат в тесте на активность оксидазы и положительный в тесте на каталазную активность.

Хемотаксономический анализ. В профиле клеточных жирных кислот доминировала насыщенная C_{16:0} (70.2%). В меньших количествах присутствовали 11-метил- C_{18:0} (15.1%) и C_{18:0} (5.6%). Другие жирные кислоты присутствовали в минорных или следовых количествах (менее 4.5% общего содержания жирных кислот). Ненасыщенные и гидроксикислоты обнаружены не были. Содержание Г+Ц в геномной ДНК штамма SVX8^T – 58.5 мол% (T_m).

Филогенетический анализ. Сравнение почти полноразмерной последовательности гена 16S рРНК штаммов SVX8^T с базой данных GenBank выявило, что он относится к порядку *Planctomycetales* (Рисунок 11) с наиболее высоким сходством (92.5%) с *Thermogutta hurogea* SBP2^T. Среди валидно-описанных видов за пределами рода *Thermogutta* наиболее близким был *Blastopirellula marina* DSM 3645^T (87.6 %).

Выделенный микроорганизм является факультативно-анаэробной и микроаэрофильной термофильной бактерией, принадлежащей порядку *Planctomycetales*, и имеющей общие с членами этого порядка морфологические и трофические характеристики. Так же как виды рода *Thermogutta*, новый изолят отличается от всех известных ранее планктомицетов способностью расти в анаэробных условиях при повышенных температурах. Низкий уровень сходства генов 16S рРНК (менее 93%) и некоторые фенотипические свойства отделяют штамм SVX8^T от представителей рода *Thermogutta* (Таблица 9). Новый штамм представляет собой первый термофильный планктомицет, выделенный из морского экотопа. В связи с этим он растет при более высокой солености среды. Он также отличается спектром используемых доноров и акцепторов электронов.

На основании филогенетического положения и фенотипических характеристик мы предложили отнести штамм SVX8^T к новому роду *Thermostilla* с типовым видом *Thermostilla marina*.

Типовой и единственный штамм SVX8^T депонирован в Японской коллекции микроорганизмов (Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center) под номером JCM 19992^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером VKM В-2881^T.

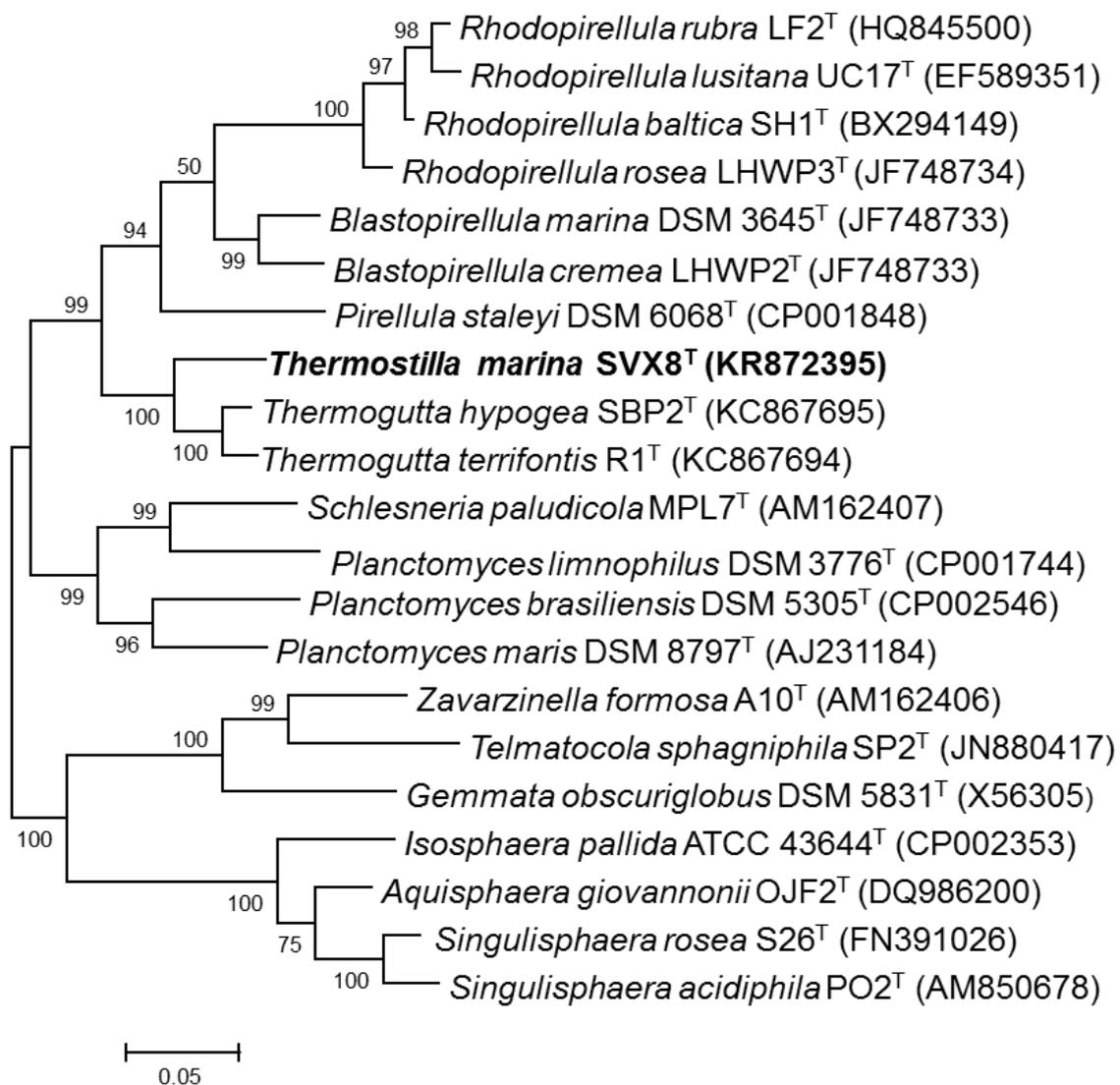


Рисунок 11. Дендрограмма, основанная на последовательности гена 16S рРНК, показывающая филогенетическое положение *Thermostilla marina* SVX8^T, масштабная линейка – 5% различия последовательностей

4.1.2. Термофильные планктомицеты

Три микроорганизма, полученные из разных экосистем, находящихся на значительном расстоянии друг от друга - из наземного горячего источника о. Кунашир, из глубокой золотодобывающей шахты ЮАР и из мелководной морской гидротермы у берегов о.Вулкано, Италия, оказались довольно близкими родственниками и образовали отдельный кластер в филуме *Planctomycetes*. Несмотря на то, что планктомицеты известны довольно давно, и были детектированы практически во всех природных и антропогенных местообитаниях, включая морские и пресноводные, почву, болота, системы очистки сточных вод и т.д., по сравнению с другими микроорганизмами они еще слабо изучены, хотя в последние годы в этой области ведется очень активная работа, и картина постоянно обновляется. Все известные на сегодняшний день планктомицеты делятся на две метаболически различные группы: литотрофные анаэробы, осуществляющие анаммокс процесс, и органотрофные аэробы, потребляющие углеводы, включая сложные полисахариды (Дедыш и Куличевская, 2010; Fuerst & Sagulenko, 2011). К началу нашей работы было валидно описано менее двух десятков родов, большая часть из которых представлена единственным видом. Планктомицеты являются мезофильными бактериями (T_{opt} не выше $35^{\circ}C$) за исключением *Isosphaera pallida* с оптимумом роста $41-42^{\circ}C$ (Giovannoni et al., 1987). Выделенные нами микроорганизмы имеют T_{opt} $52-60^{\circ}C$, и таким образом являются первыми термофильными представителями филума.

Филум *Planctomycetes* включает в себя микроорганизмы с уникальными свойствами, не характерными для других бактерий, включая морфологию, способ размножения и жизненный цикл, включающий подвижную и неподвижную фазу, а также устойчивость к антибиотикам пенициллинового ряда. Первые планктомицеты, описанные в 1924 году (Gimesi, 1924), были клетками со стебельками, которые ошибочно приняли за грибные гифы со спорангиями, отсюда и название *Planctomycetes* – плавающие грибы. За несколькими исключениями, все планктомицеты размножаются почкованием. Дочерняя клетка подвижна

и имеет довольно толстый полярный жгутик. Зрелые клетки теряют подвижность и образуют длинные цепочки, розетки или большие агрегаты (Дедыш и Куличевская, 2010; Fuerst & Sagulenko, 2011). Много лет к уникальным свойствам причисляли и внутреннее строение клетки, включавшее деление ее внутрицитоплазматической мембраной на компартменты – парихоплазм и пиреллулосому. Недавние исследования показывают, что планктомицеты можно считать бактериями, обладающими одним из вариантов грамотрицательного типа клеточной стенки, которые отличаются увеличенным периплазматическим пространством и склонностью цитоплазматической мембраны к инвагинациям (Voedeker et al., 2017). Все эти свойства планктомицетов, как и спектр потребляемых субстратов, оказались характерными и для термофильных видов (Таблица 9). Основные отличия от органотрофных планктомицетов, помимо температуры роста, состоят в способности к анаэробному росту за счет окисления органических субстратов и восстановления нитрата, нитрита или серы в качестве акцептора электронов и неспособности расти при атмосферной концентрации кислорода. Сведения об анаэробном росте и восстановлении нитрата для аэробных организмов приводятся редко. Для мезофильных органотрофных планктомицетов способность к анаэробному росту за счет брожения была показана для *Schlesneria paludicola* и *Phycisphaera mikurensis*; для них же сообщается о положительных результатах тестов на нитрат-редукцию (Kulichevskaya et al., 2007; Fukunaga et al., 2009). Есть сообщения о восстановлении нитрата *Planctomyces limnophilus* и *P. brasiliensis* (Hirsch and Müller, 1985; Schlesner, 1989), однако они носят противоречивый характер. Данные об анаэробном росте планктомицетов за счет восстановления нитрата отсутствуют. Способность расти с восстановлением элементной серы была показана для одного штамма, Zi62, выделенного из насыщенных сульфидом осадков источника в Оклахоме, США (Elshahed et al., 2007); для валидно-описанных планктомицетов такого свойства показано не было.

Таблица 9. Характеристика первых термофильных представителей филума

Planctomycetes

Характеристика	<i>Thermogutta terrifontis</i> R1 ^T	<i>Thermogutta hypogea</i> SBP2 ^T	<i>Thermostilla marina</i> SVX8 ^T
Диапазон T роста, °C (опт)	25-(55-60)-68	30-(52)-60	30-(55)-68
Диапазон pH роста (опт)	4.0-(5.5-6.6)-8.0	5.0-(7.5-8.0)-9.0	5.0-(7.0-8.0)-9.0
Соленость, % NaCl (опт)	0-(0)-2.5	0-(0)-2.5	0.8-(2.5-3.5)-4.5
Доноры электронов			
Глюкоза, мальтоза, сахароза, трегалоза, целлобиоза, ксилан, крахмал, пектин, ксантановая камедь	+	+	+
Фруктоза, ксилоза, манноза	+	+	-
Арабиноза, агароза	-	+	+
Лактоза, галактоза	-	+	-
Целлюлоза, инулин, маннит, сорбит, спирты, орг. кислоты, пептон, дрожжевой экстракт	-	-	-
Акцепторы электронов			
NO ₃ ⁻	+	+	+
NO ₂ ⁻	+	+	-
S ⁰	-	+	+
Продукт восстановления NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻
Макс. концентрация O ₂ (%)	10	10	2

Для клеточных жирных кислот мезофильных планктомицетов группы *Pirellula*–*Rhodopirellula*–*Blastopirellula* характерно доминирование C_{18:1 ω9c} и C_{16:0} (Schlesner et al., 2004). Жирная кислота C_{16:0} также является основной у термофильных видов однако, у них в составе жирных кислот нет ненасыщенных, что, возможно, является специфической чертой, присущей только термофильным планктомицетам (Таблица 10). В отличие от членов рода

Thermogutta, в составе жирных кислот *Thermostilla marina* SVX8^T больше разветвленных кислот и почти нет длинноцепочечных, с 20 атомами углерода.

Таблица 10. Состав жирных кислот термофильных представителей филума *Planctomycetes*

Жирная кислота	<i>Thermogutta terrifontis</i>	<i>Thermogutta hypogea</i>	<i>Thermostilla marina</i>
C _{14:0}	1.4	1,0	2.8
iso-C _{15:0}	3.0	0.1	-
anteiso-C _{15:0}	0.2	0.6	-
C _{15:0}	0.9	0.6	-
iso-C _{16:0}	0.8	0.2	-
C_{16:0}	48.5	61.2	70.2
iso-C _{17:0}	1.6	0.4	4.3
C_{18:0}	27.9	18.7	5.6
C_{19:0}	0.6	9.2	-
iso-C_{19:0}	7.6	-	15.1
C_{20:0}	6.9	8.2	2.1

Данные, полученные в процессе культивирования и изучения физиологии термофильных планктомицетов, указывают на более широкую экологическую роль представителей филума *Planctomycetes*. Эти организмы могут участвовать в разложении органического вещества, в частности, полисахаридов не только при низких температурах и в аэробных условиях, но и в экотопах с повышенными температурами и, как следствие, с более низким содержанием кислорода, как за счет брожения, так и за счет анаэробного дыхания, связывая круговороты углерода, азота и серы и участвуя в биогеохимических циклах этих важнейших биогенных элементов.

4.1.3. Распространение новых органотрофных нитратвосстанавливающих бактерий

Для анализа микробного разнообразия в последнее время стали широко использоваться методы высокопродуктивного секвенирования, главным образом на платформах Roche/454 Titanium FLX и Illumina MiSeq или HiSeq. Базы данных, содержащие нуклеотидные последовательности, полученные такими методами, в настоящий момент находятся еще в стадии формирования. Кроме того, эти методы основаны на использовании коротких гипервариабельных участков генов 16S рРНК (200-500 нуклеотидов), что не всегда позволяет с уверенностью отнести полученную индивидуальную последовательность к определенному роду. В данной работе для оценки географического распространения родов, к которым относятся выделенные нами микроорганизмы, мы учитывали содержащиеся в базе данных GenBank последовательности изолятов и некультивируемых организмов (филотипов) длиной не менее 1400 нуклеотидов.

Оценка распространенности новых органотрофных нитратредукторов показала, что род *Terpidibacillus*, вероятно, можно считать представителем глубинной биосферы, поскольку два новых вида и близкородственные филотипы, как и типовой вид, были получены из подземных местообитаний, из шахт или подземного месторождения песчаника. Один филотип был детектирован в микробной топливной ячейке, инокулированной сброженным илом из очистных сооружений. География распространения этого рода охватывает почти все материка: Евразию, Северную Америку и Африку (Таблица 11).

Два термофильных планктомицета были выделены из континентальной гидротермы и глубокой шахты. Родственные им филотипы были также детектированы в наземных и подземных местообитаниях. Несмотря на то, что глубинные экотопы, как правило, характеризуются низким содержанием органического углерода, большая часть выделенных из них термофильных прокариот являются облигатными или факультативными органотрофами (Слободкина и Слободкин 2005). Эти факты говорят о наличии широкой детритной цепи, основу которой составляют микроорганизмы-деструкторы.

Предпочтительными субстратами для представителей новых родов, *Tepidibacillus* и *Thermogutta*, являются сложные белковые или углеводные полимеры. В подземных биотопах эти организмы могут входить в микробные сообщества, развивающиеся в биопленках, где клетки связаны внеклеточным полимерным матриксом, состоящим из экзополисахаридов, ДНК и белков, которые, как и продукты разложения биомассы, могут служить для них субстратами. О развитии в виде биопленок свидетельствует и склонность *Thermogutta* к образованию больших агрегатов. Родственные *Tepidibacillus* и *Thermogutta* флотипы были также детектированы в экосистемах, связанных с очисткой сточных вод в термофильных анаэробных режимах, для которых также характерно образование биопленок. Довольно широкий диапазон рН роста представителей *Thermogutta* позволяет им адаптироваться к различным внешним условиям, что подтверждается выявлением их как в нейтральных, так и в щелочных наземных горячих источниках. Нуклеотидные последовательности бактерий, которые можно приписать к роду *Thermogutta*, были обнаружены в различных регионах, в том числе в Италии, Папуа Новой Гвинее, России, США, ЮАР и Японии (Таблица 11).

В базе данных не оказалось организмов, имеющих сходство с *Thermostilla marina* на уровне одного рода. Ближайшая некультивируемая бактерия имеет 92% сходства генов 16S рРНК и, очевидно, является представителем другого рода планктомицетов (Таблица 11). Она также был детектирован в морской экосистеме, но в глубоководной в отличие от местообитания *Thermostilla marina*.

Таблица 11. Географическое распространение родов (по базе данных GenBank), в которые входят новые органотрофные нитратвосстанавливающие бактерии

Организм (номер в GenBank)	Длина, п.н.	% сходства гена 16S рРНК	Место обнаружения	Ссылка
<i>Tepidibacillus fermentans</i> (KC242245)	1589		Подземное газохранилище Северо-Ставропольское (глубина 800-1000 м), Россия	Slobodkina et al., 2012
<i>Tepidibacillus infernus</i> (KU726543)	1412	97	Микробный мат, развивающийся в месте высачивания воды, золотодобывающая шахта Тау Тона (глубина 3.54 км), ЮАР	Podosokorskaya et al., 2016
<i>Tepidibacillus decaturensis</i> (KP898733)	1512	97	Грунтовая вода из подземного месторождения кварцевого песчаника (глубина 1,7 км), гора Симон, Иллинойс, США	Dong et al., 2016
Некультивир. <i>Bacillus</i> sp. TA2_B3 (JQ993886)	1540	99	Термофильная микробная топливная ячейка, инокулированная сброженным илом из очистных сооружений, Япония	Fu et al., 2013
Некультивир. <i>Bacilli</i> 4_50_75 1 Lib4 (KJ650752)	1515	97	Стоки умеренно-кислых шахтных вод, Селеби-Фикве (Ботсвана), Фрайберг (ФРГ) и Кристинеберг (Швеция)	Korehi et al., 2014
Некультивир. <i>Bacilli</i> 1_12_31 2 Lib1 (KJ650714)	1511	95	Стоки умеренно-кислых шахтных вод, Селеби-Фикве (Ботсвана), Фрайберг (ФРГ) и Кристинеберг (Швеция)	Korehi et al., 2014
Некульт. бактерия Z6S24П18 (KM105823)	1427	97	Подземное месторождение кварцевого песчаника (глубина 1.7-2.0 км), гора Симон, Иллинойс, США	Dong et al., 2014
Некульт. бактерия Z9S6I30 (KM105802)	1476	97	Подземное месторождение кварцевого песчаника (глубина 1.7-2.0 км), гора Симон, Иллинойс, США	Dong et al., 2014

Таблица 11 (продолжение)

Некульт. <i>Firmicutes</i> D25_16 (EU266895)	1503	95	Загрязненная нефтяными смолами почва (глубина 5.7-12.7 м), Дюссельдорф, ФРГ	Winderl et al., 2008
Некульт. <i>Firmicutes</i> D25_03 (EU266886)	1504	95	Загрязненная нефтяными смолами почва (глубина 5.7-12.7 м), Дюссельдорф, ФРГ	Winderl et al., 2008
Некульт. <i>Firmicutes</i> D12_14 (EU266821)	1503	95	Загрязненная нефтяными смолами почва (глубина 5.7-12.7 м), Дюссельдорф, ФРГ	Winderl et al., 2008
Некульт. бактерия EDW07B002_19 (HM066339)	1533	95	Вода из карстового водоносного горизонта Эдвардс (глубина 200 м), Техас, США	Gray & Engel, 2013
<i>Thermogutta terrifontis</i> (KC867694)	1483		Гидротермальный источник, о. Кунашир, Курильские острова, Россия	Slobodkina et al., 2015
<i>Thermogutta hypogea</i> (KC867695)	1445	97	Золотодобывающая шахта Беатрикс, ЮАР	Slobodkina et al., 2015
<i>Planctomycetales</i> sp. VM20-7	1450	96	Очистные сооружения, Япония	Qiu and Sekiguchi, 2010, неопубл.
Некультивир. <i>Planctomycetales</i> OPB17 (AF027057)	1464	100	Наземная гидротерма, Национальный парк Йеллоустоун, США	Hugenholtz et al., 1998
Некультивир. <i>Planctomycetales</i> OPB6 (AF027058)	1464	99	Наземная гидротерма, Национальный парк Йеллоустоун, США	Hugenholtz et al., 1998

Таблица 11 (окончание)

Некультивир. бактерия PNG_Кар3_B204 (JF935179)	1444	99	Горячие щелочные источники, о. Амбитл, Папуа Новая Гвинея	Amend et al., 2011, неопубл
Некультивир. планктомицет B6_BAC_TAD (KJ626488)	1507	98	Термофильное анаэробное разложение активного ила, Италия	Gagliano and Rossetti, 2014, неопубл.
Некультивир. бактерия HMTAb164 (KM373071)	1503	97	Метантенк, Япония	Nobu et al., 2014, неопубл
Некультивир бактерия BF_24 (KJ830143)	1489	96	Биопленки терефталат-разлагающего метаногенного микробного сообщества из лабораторного реактора, Тайвань	Huang et al., 2014
Некультивир. бактерия PNG_Кар3_B360 (JF935188)	1428	95	Горячие щелочные источники, о. Амбитл, Папуа Новая Гвинея	Amend et al., 2011, неопубл
Некультивир бактерия AS07-7-28 (KM410323)	1444	95	Биопленки из подземных пещер Фрасасси и Аквасанта Терме, Италия	Jones et al., 2015
Некультивир. бактерия TTA_B31 (AY297974)	1403	95	Лабораторный гибридный реактор, (Сингапур)	Chen et al., 2004
<i>Thermostilla marina</i> (KR872395)	1490		Мелководная морская гидротерма (о. Вулкано, Италия).	Slobodkina et al., 2016
Некульт.бактерия T3-1_131 (KX097655)	1492	92	Гидротермальные отложения и донные осадки Окинавской Впадины, Тихий океан	Wang et al., 2016, неопубл.

Таким образом, результаты нашей работы расширили круг культивируемых органотрофных нитратредуцирующих бактерий. Выделение новых микроорганизмов из подземного газохранилища и глубокой золотодобывающей шахты расширяют представления о микробном биоразнообразии подземной биосферы - одного из самых малоизученных экотопов. Наиболее значимым результатом является обнаружение, выделение в чистую культуру и описание первых термофильных представителей филума *Planctomycetes*.

4.2. Литоавтотрофные сероокисляющие нитратвосстанавливающие бактерии

4.2.1. Выделение и характеристика и новых таксонов литоавтотрофных нитратредукторов

Для выделения анаэробных термофильных литоавтотрофных сероокисляющих нитратвосстанавливающих микроорганизмов использовали пробы осадка, воды и обрастаний, отобранных из наземных и мелководных морских гидротерм Кунашира и Камчатки, а также из глубоководных гидротермальных построек спредингового центра Восточное Лау, Тихий океан (Таблица 4 в Главе 3 Материалы и методы). Филогенетический анализ полученных чистых культур на основе гена 16S рРНК выявил, что две бактерии (штаммы S2479 и ST65) являются представителями новых родов, относящихся к филумам *Proteobacteria* (класс *Gammaproteobacteria*, порядок *Chromatiales*) и *Thermodesulfobacteria*. со сходством генов 16S рРНК с ближайшими родственными организмами 90-92%. Штаммы 378 и 443 принадлежат родам *Thermosulfurimonas* и *Persephonella*, соответственно, со сходством генов 16S рРНК с ближайшими родственными организмами около 97%. Остальные чистые культуры представляют новые штаммы ранее описанных видов бактерий, принадлежащих порядкам *Aquificales*, *Chromatiales* и *Thermodesulfobacteriales* (уровень сходства генов 16S рРНК с ближайшими родственными организмами 99.1-99.7%). Рост с окислением серы и восстановлением нитрата был ранее показан для членов классов *Gammaproteobacteria* и

Aquificae. О способности представителей *Thermodesulfobacteria* окислять серу и ее соединения, а также восстанавливать нитрат, ранее известно не было.

Таблица 12. Получение чистых культур литотрофных сероокисляющих нитратредукторов

Проба	Условия культивирования		Чистая культура, штамм	Ближайший родственный организм / порядок	Сходство генов 16S рРНК (%)
	Т°С	Соленость среды			
24	65	Морская	S2479	<i>Thioalcalivibrio denitrificans</i> / <i>Chromatiales</i>	92.3
24	65	Морская	2488	<i>Hydrogenivirga caldilitoris</i> / <i>Aquificales</i>	99.1
37Н	65	Морская	378	<i>Thermosulfurimonas dismutans</i> / <i>Thermodesulfobacteriales</i>	97.9
38Н	65	Морская	S38	<i>Hydrogenivirga okinawensis</i> / <i>Aquificales</i>	99.3
32	65	Пресная	328	<i>Hydrogenobacter subterraneus</i> / <i>Aquificales</i>	99.3
3431	65	Пресная	76	<i>Caldimicrobium rimae</i> / <i>Thermodesulfobacteriales</i>	99.6
Mar437	50	Морская	Mar	<i>Thiopfundum hispidum</i> / <i>Chromatiales</i>	99.4
Mar443	65	Морская	443	<i>Persephonella hydrogeniphila</i> / <i>Aquificales</i>	97.2
Tui Malila	65	Морская	ST65	<i>Thermosulfurimonas dismutans</i> / <i>Thermodesulfobacteriales</i>	89.5

К началу нашей работы большинство анаэробных сероокисляющих прокариот составляли мезофильные бактерии, принадлежащие филуму *Proteobacteria*. Среди термофилов было известно менее 10 видов, способных к анаэробному окислению элементарной серы с нитратом: представители филума *Aquificales*, и две умеренно-термофильные бактерии, принадлежащие к *Alfa*- и *Gamma*- классам *Proteobacteria* (Reysenbach, 2001, Takai et al., 2009). Нами были выделены, описаны и узаконены как новые таксоны два штамма термофильных бактерий, способных расти за счет окисления соединений серы с нитратом. Один из них, штамм S2479^T, относится к классу

Gammaproteobacteria и является самой термофильной анаэробной протеобактерией. Второй, штамм ST65^T, принадлежит к филуму *Thermodesulfobacteria*. Представители данного филума до этого рассматривались исключительно как участники восстановительной части цикла серы и способность к ее окислению, как и нитрат-редукция ранее показаны не были.

***Inmirania thermothiophila* S2479^T gen. nov., sp. nov.**

Штамм S2479^T был выделен из пробы песка и воды из гидротермы, расположенной в приливной зоне гидротермально нагреваемого пляжа (43° 59.742' N 145° 48.166'E), о. Кунашир (Курильские острова, Россия). Образцы были отобраны анаэробно в плотно закрытые флаконы и хранились при +4°C до начала работы.

Морфология клеток. Клетки штамма S2479^T представляли собой прямые или слегка изогнутые палочки с круглыми концами, 0.6-0.7 мкм толщиной и 1.0-2.0 мкм длиной (Рисунок 12а). Клетки встречались в виде отдельных клеток и были подвижны благодаря одному полярному жгутику. Образования эндоспор не наблюдалось. Ультратонкие срезы штамма S2479^T показали наличие типичной для грамотрицательных бактерий внешней мембраны (Рисунок 12b). Внутриклеточных мембран не наблюдалось.

Физиологические характеристики. Температурный диапазон для роста штамма S2479^T составлял 35-68°C, с оптимумом при 65°C. Роста не наблюдалось при 70°C и выше или при температурах 30°C и ниже после трёх недель инкубации. Штамм S2479^T рос в диапазоне pH от 5.5 до 8.8, с оптимумом при pH 6.5. При pH 5.0 и ниже или pH 9.0 и выше роста отмечено не было. Рост штамма S2479^T наблюдался при концентрации NaCl в среде от 0.5 до 3.5% (вес/об.), с оптимумом при 1.5-2.0 % (вес/об.); роста не было в отсутствие NaCl или при его концентрации 4.0% (вес/об.) и выше.

Изолят рос хемолитоавтотрофно в анаэробных условиях, сочетая окисление элементной серы (5.0 г/л) или тиосульфата (15 мМ) с восстановлением нитрата (10 мМ).

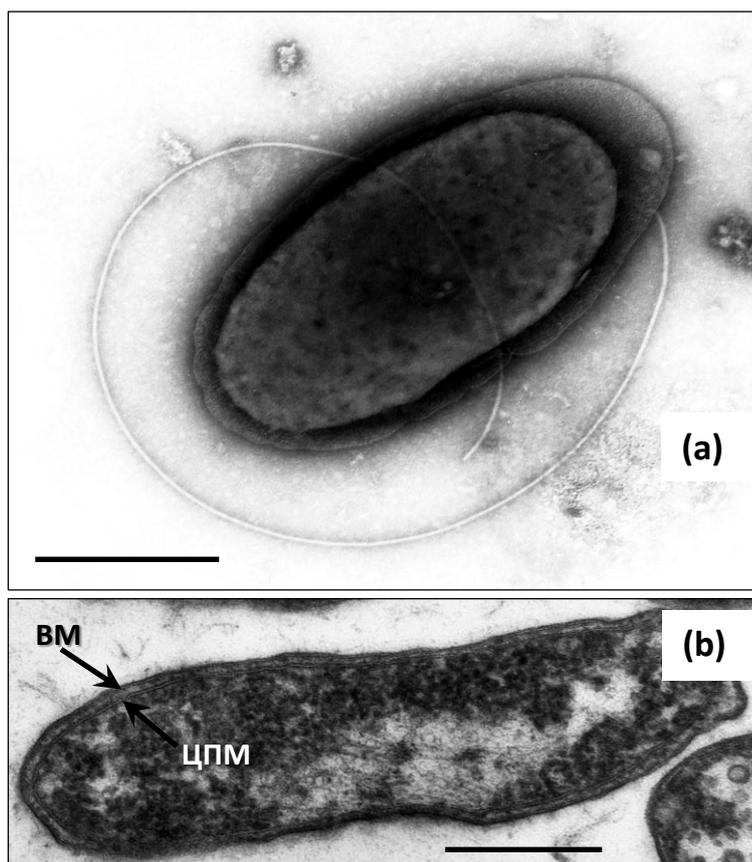


Рисунок 12. Морфология клеток *Immirania thermothiophila* S2479^T. (а) Электронная микрография негативно окрашенных клеток штамма, показывающая морфологию клетки и положение жгутика; (б) Ультратонкий срез, показывающий строение клеточной стенки. ЦПМ, цитоплазматическая мембрана, ВМ, внешняя мембрана. Масштабная линейка, 0.5 мкм

Соединения серы окислялись до сульфата, нитрат восстанавливался до молекулярного азота без образования нитрита или аммония. Дрожжевой экстракт не был обязательным для роста, но добавление как минимум 0.1 мг/л значительно стимулировало рост. Время удвоения при росте с тиосульфатом и нитратом в присутствии и в отсутствие дрожжевого экстракта составляло 2.0 ч и 3.6 ч, соответственно. Рост с молекулярным водородом (H₂/CO₂ 80/20 (об.)) был возможен только при добавлении 0.1 г/л дрожжевого экстракта. Изолят рос также хемоорганогетеротрофно в присутствии 0.1 г/л дрожжевого экстракта с нитратом в качестве акцептора электронов и с ацетатом, формиатом, пропионатом, бутиратом, лактатом, малатом, пируватом, сукцинатом (10 мМ каждого), пептоном или дрожжевым экстрактом (2.0 г/л каждого) в качестве донора. Роста не было с сульфитом (5 мМ), сульфидом (0.2, 0.5

или 2.0 мМ), метанолом, этанолом, глицерином, фумаратом (10 мМ каждого), глюкозой, фруктозой, сахарозой, арабинозой или мальтозой (2.0 г/л каждого) в присутствии 0.1 г/л дрожжевого экстракта и нитрата (10 мМ). Штамм S2479^T не рос без добавления внешнего акцептора электронов за счет брожения с пируватом, лактатом, малатом, сукцинатом (10 мМ каждого), фруктозой или дрожжевым экстрактом (2.0 г/л каждого).

Потенциальные акцепторы электронов проверяли с ацетатом (10 мМ) в качестве донора в присутствии 0.1 г/л дрожжевого экстракта. Нитрат (10 мМ) поддерживал рост изолята, тогда как сульфат (14 мМ), сульфит (5 мМ), элементная сера (5.0 г/л), тиосульфат (15 мМ) нитрит (2.5 мМ) и ферригидрит (90 ммоль Fe(III)/л) не использовались как акцепторы электронов. Штамм S2479^T не рос при атмосферной концентрации кислорода, однако мог расти микроаэробно (1% (об.) O₂ в газовой фазе) с элементной серой, тиосульфатом, ацетатом или сукцинатом. Изолят не рос фототрофно в анаэробных условиях с элементной серой (5.0 г/л), тиосульфатом (15 мМ), водородом (H₂/CO₂ 80/20 (об.)), ацетатом или пируватом (10 мМ каждого) в присутствии 0.1 г/л дрожжевого экстракта. Изолят имел положительный результат в тесте на активность оксидазы и отрицательный в тесте на каталазную активность.

Хемотаксономический анализ. В профиле клеточных жирных кислот доминировали насыщенная C_{16:0} (48.5%) и ненасыщенная C_{18:1ω7c} (30.1%). В меньших количествах присутствовали C_{18:0} (8.7%) и C_{19:0} (5.5%). Другие жирные кислоты присутствовали в минорных или следовых количествах (менее 4.5% общего содержания жирных кислот). Содержание Г+Ц в геномной ДНК штамма S2479^T – 71.5 мол% (T_m).

Филогенетический анализ. Сравнение 1521 п.н. последовательности гена 16S рРНК с базами данных GenBank и EzTaxon показало, что выделенный штамм принадлежит семейству *Ectothiorhodospiraceae* порядка *Chromatiales*, класс *Gammaproteobacteria* (Рисунок 13).

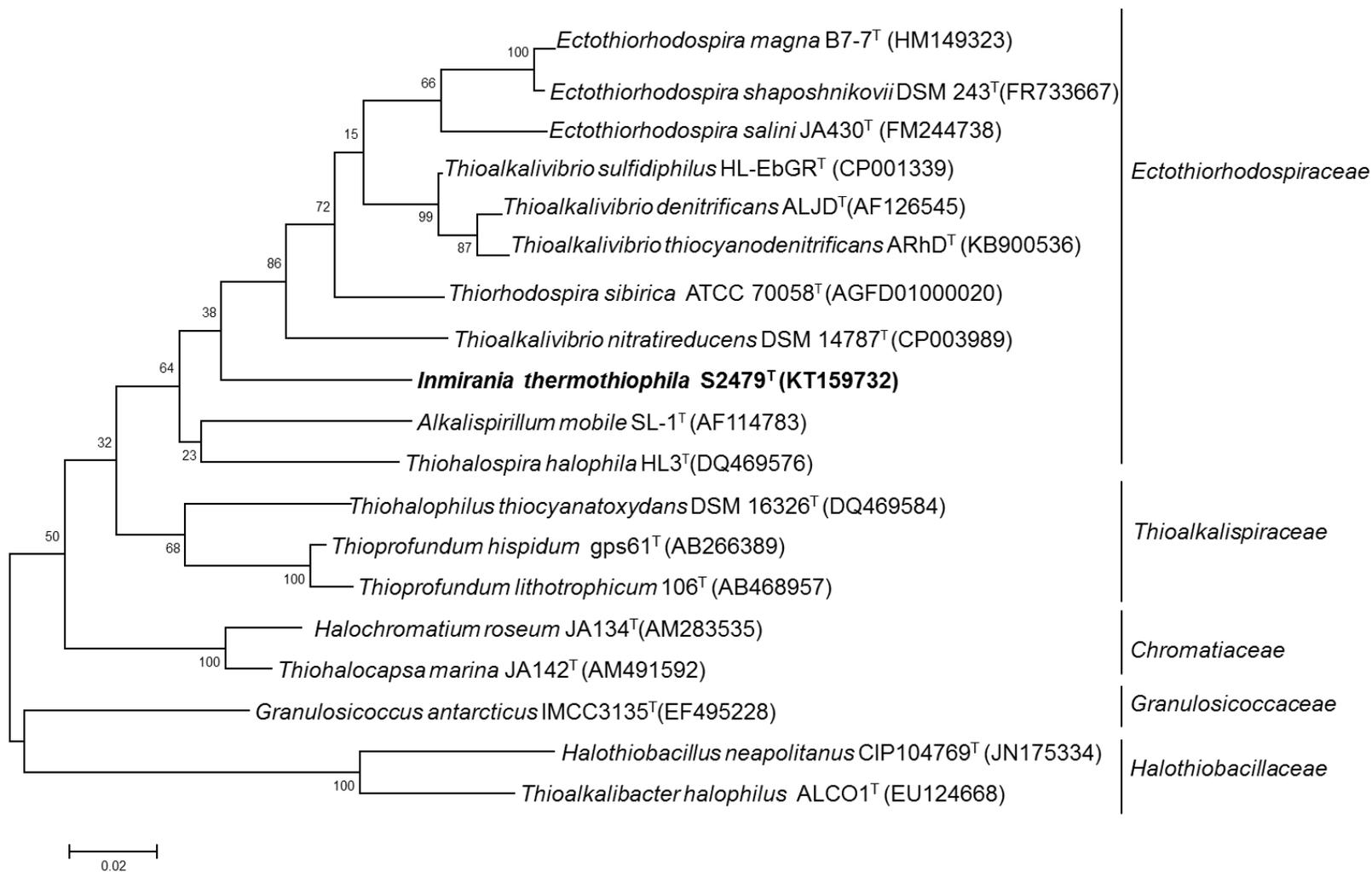


Рисунок 13. Дендрограмма, основанная на последовательности гена 16S рPHК, показывающая филогенетическое положение *Inmirania thermothiophila* S2479^T, масштабная линейка – 2% различия последовательностей.

Это семейство метаболически разнородно, и в его состав входят фототрофные пурпурные бактерии, осуществляющие аноксигенный фотосинтез, строго хемолитоавтотрофные, хемогетеротрофные и факультативно метилотрофные бактерии (Oren, 2013). Штамм S2479^T имеет наибольшее сходство гена 16S рНК с фототрофом *Ectothiorhodospira salini* (92.34 %) и строгим хемолитотрофом *Thioalkalivibrio denitrificans* (92.26%). Представители этих родов, так же, как и штамм S2479^T, являются подвижными бесспорными грамотрицательными палочками, способными к литоавтотрофному анаэробному окислению соединений серы. Другими общими чертами являются необходимость NaCl для роста и дыхательный метаболизм с нитратом или кислородом в качестве акцепторов электронов. Субстраты, используемые новым штаммом для хемогетеротрофного роста, практически совпадают с теми, которые члены рода *Ectothiorhodospira* утилизируют для фотогетеротрофного роста. Состав жирных кислот также сходен с жирными кислотами представителей семейства *Ectothiorhodospiraceae* (Sorokin et al., 2012; Thiemann & Imhoff, 1996; Oren, 2013). Из-за отсутствия внутриклеточных фотосинтетических мембран культуры клеток штамма S2479^T бесцветны и неспособны к фотосинтезу, что несомненно отличает его от членов рода *Ectothiorhodospira* (Таблица 13). Виды рода *Thioalkalivibrio* – облигатные алкалофилы, не растущие при pH ниже 7.5, тогда как штамм S2479^T является нейтрофилом. Также, в отличие от членов рода *Thioalkalivibrio*, строгих литоавтотрофов, штамм S2479^T может расти органотрофно. За исключением двух видов рода *Methylothermus* (Tsubota et al., 2005; Hirayama et al., 2011) и нескольких видов, имеющих T_{опт} 45-50°C, в класс *Gamma*proteobacteria входят исключительно мезофилы, таким образом, S2479^T с T_{опт} 65°C является самым высокотемпературным анаэробным представителем класса. На основании результатов филогенетического анализа и исследования физиологических свойств, мы предложили отнести штамм S2479^T к новому роду *Inmirania* с типовым видом *Inmirania thermothiophila*.

Inmirania - произвольное имя, образованное от аббревиатуры названия Института микробиологии Российской Академии Наук (ИНМИ РАН), внесшего значительный вклад в микробиологию, особенно в изучение циклов серы и азота.

Типовой и единственный штамм S2479^T депонирован в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) под номером DSM 100275^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером VKM В-2962^T.

Таблица 13. Дифференцирующие характеристики *Inmirania thermothiophila* S2479^T и филогенетически близких родов

Характеристика	S2479 ^T	<i>Ectothiorhodospira</i> [§]	<i>Thioalkalivibrio</i> [§]
Источник выделения	Мелководная морская гидротерма	Эстуарии рек, солончаки, соленые и содовые озера	Содовые озера
Температура роста, °С	35-68	20-45	До 41
Оптimum, °С	65	25-40	30-35
pH роста	5.5-8.8	7.0-11.0	7.5-10.65
Оптimum pH	6.5	7.5- (9.0-10.0)	(8.0-9.0) – (10.0-10.2)
Соленость, % NaCl (вес/об.)	0.5-3.5	0-20	1.2-10.5, некоторые штаммы до 29.2
Оптimum NaCl (% вес/об.)	1.5-2.0	0.5-8.0	2.3-11.7
Фототрофный рост	-	+	-
Гетеротрофный рост	+	+	-
Окисление сульфида	-	+*	+
Восстановление нитрата	+	-	+/-**
Содержание Г+Ц в ДНК, (мол%)	71.5	59.2–68.4.	61.3-66.9

[§] данные по Oren (2013)

*все штаммы за исключением *E. salini*

** некоторые виды

Thermosulfuriphilus ammonigenes ST65^T gen. nov., sp. nov.

Штамм ST65^T был выделен из фрагмента гидротермальной постройки («черного курильщика»), отобранной на глубоководном гидротермальном поле Туи Малила (Tui Malila) (176° 34.06' W, 21° 59.35' S) средингового центра Лау в юго-восточной части Тихого океана в июне 2009 года. Отбор проб с глубины 1870 м производился с помощью автоматического спускаемого аппарата JASON II. На борту исследовательского судна в стерильных анаэробных условиях (под током N₂) образцы измельчали и помещали в стеклянные стерильные пробирки с морской водой. Полностью заполненные пробирки закрывали резиновой пробкой и алюминиевой крышкой и хранили при +4°C.

Морфология клеток. Клетки нового изолята представляли собой неподвижные прямые или слегка изогнутые короткие палочки или овалы 0.5-0.6 мкм в диаметре и длиной 0.8-1.5 мкм (Рисунок 14а). Формирования спор не наблюдалось. Ультратонкие срезы штамма ST65^T выявили грамотрицательный тип клеточной стенки (Рисунок 14b, c).

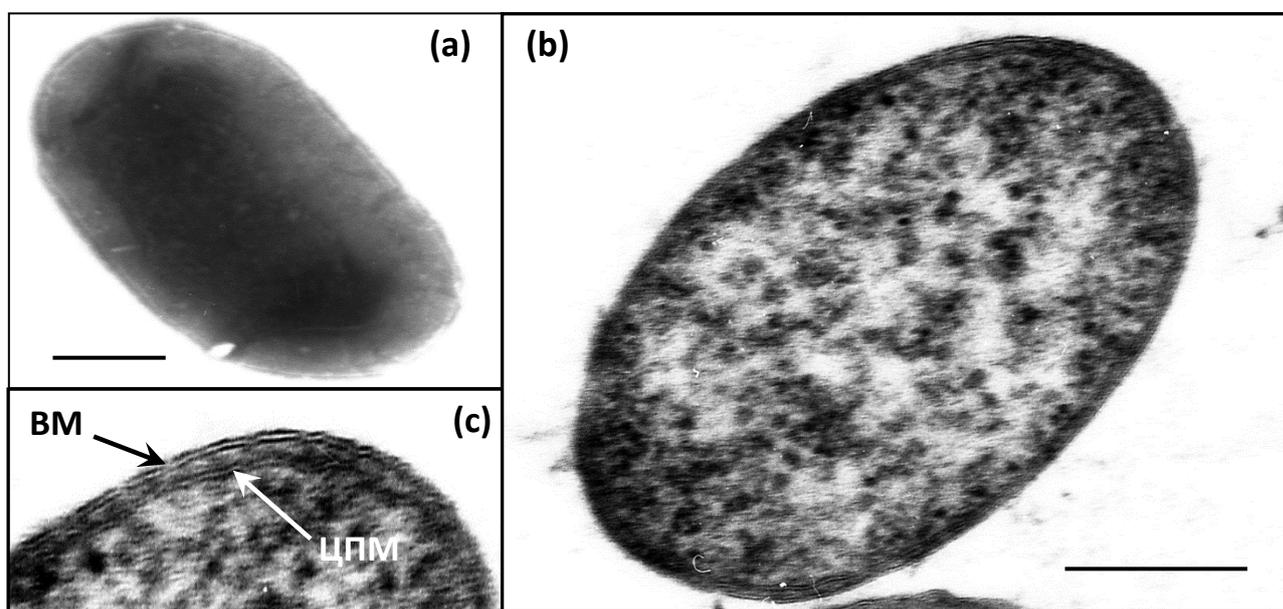


Рисунок 14. Морфология клеток *Thermosulfuriphilus ammonigenes* ST65^T. (а) Электронная микрография негативно окрашенных клеток штамма, показывающая морфологию клетки, масштабная линейка, 0.2 мкм; (b) Ультратонкий срез, показывающий строение клеточной стенки, бар 0.2 мкм; (c) увеличенное изображение, показывающее ультраструктуру с цитоплазматической мембраной (ЦПМ) и внешней мембраной (ВМ); масштабная линейка, 0.1 мкм.

Физиологические характеристики. Температурный диапазон роста штамма ST65^T составлял 47-75°C с оптимумом при 65°C. Роста не наблюдалось при 80°C и выше и при 42°C и ниже в течение 3х недель инкубации. Диапазон pH составлял 5.5-7.5 с оптимумом при pH 6.5. Роста не было при pH 5.0 и ниже и 8.0 и выше. Штамм рос при концентрации NaCl от 1.5 до 4.5% (вес/об.) с оптимумом при 2.0-2.5%(вес/об.) и не рос при 1.0%(вес/об.) и ниже или при 5.0% (вес/об.) и выше.

Изолят рос хемолитоавтотрофно в анаэробных условиях, сочетая окисление элементарной серы (5.0 г/л) или тиосульфата (15 мМ) с восстановлением нитрата (10 мМ). Конечным продуктом окисления соединений серы был сульфат, нитрат полностью восстанавливался в аммоний. Образования нитрита или молекулярного азота не детектировалось. Добавление дрожжевого экстракта (0.2 г/л) не оказывало влияния на рост штамма с серой и нитратом. Сульфит (0.5, 2.5 или 5.0 мМ) или сульфид (0.2, 0.5 или 2.0 мМ) не поддерживали рост с нитратом. Штамм ST65^T мог также расти за счет диспропорционирования элементарной серы с $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ в качестве единственного источника углерода в присутствии ферригидрита для связывания образующегося сульфида. Ферригидрит превращался в черный немагнитный Fe(II) содержащий осадок, предположительно FeS. В отсутствие ферригидрита рост штамма ST65^T наблюдался только в культивационных флаконах с большой газовой фазой (соотношение газ:жидкость не менее 10:1). Рост сопровождался накоплением сульфата и сульфида. Штамм также рос за счет диспропорционирования тиосульфата (15 мМ) или сульфита (2.5 мМ). Так же, как и в случае с диспропорционированием серы, для роста с тиосульфатом или сульфитом в отсутствие ферригидрита требовалась большая газовая фаза. Добавление H_2/CO_2 (80:20 (об.)), ацетата, малата, малеината, пирувата или фумарата (10 мМ каждого), дрожжевого экстракта или пептона (2.0 г/л каждого) не стимулировало рост штамма в присутствии серы и ферригидрита. Роста не наблюдалось с ацетатом, формиатом, лактатом, пируватом, фумаратом, малатом, малеинатом, сукцинатом, этанолом, пропанолом, глицерином,

глицином, аланином (10 мМ каждого), глюкозой, фруктозой, мальтозой, дрожжевым экстрактом или пептоном (2.0 г/л каждого) в качестве донора электронов и нитратом (10 мМ) в качестве акцептора электронов. Изолят не рос и не восстанавливал сульфат (14 мМ), элементарную серу (5.0 г/л) или ферригидрит (90 ммоль Fe(III)/л) с водородом (H₂/CO₂ (80:20 (об.)), ацетатом, лактатом, пируватом, малатом, этанолом (10 мМ каждого) или пептоном (2.0 г/л). Он также не рос и не восстанавливал нитрат (10 мМ), нитрит (2.5 мМ), тиосульфат (15 мМ), сульфит (5 мМ), фумарат (10 мМ) или цитрат Fe(III) (10 мМ) с водородом как донором электронов. Штамм ST65^T не рос за счет окисления элементарной серы (5.0 г/л) с нитритом (0.6, 1.2 или 2.5 мМ) или кислородом (2.0, 10 или 20% (об.) в газовой фазе). Изолят не сбраживал глюкозу, фруктозу, мальтозу, сахарозу, арабинозу, пируват (10 мМ каждого) или пептон (2.0 г/л).

Хемотаксономический анализ. Профиль жирных кислот включал в себя насыщенные и ненасыщенные прямоцепочечные и циклические кислоты. Основными жирными кислотами были C_{18:1} ω7 и C_{16:0} (34.7 и 29.6%, соответственно). В меньших количествах присутствовали C_{18:0} (12.1%), C₁₉ cyclo (11.2%) и C₁₇ cyclo (5.4%). Другие жирные кислоты присутствовали в минорных или следовых количествах (менее 4.5% общего содержания жирных кислот). Содержание Г+Ц в геномной ДНК штамма ST65^T – 49.6 мол% (T_m).

Филогенетический анализ. Сравнение 1532 п.н. последовательности гена 16S рРНК с базой данных GenBank показало, что штамм ST65^T имеет отдаленное родство с видами филума *Thermodesulfobacteria* (87.6-89.5%). Наиболее близкородственными организмами оказались *Thermosulfurimonas dismutans* S95^T и *Thermodesulfatator atlanticus* AT1325^T, 89.5% сходства генов 16S рРНК (Рисунок 15). За пределами этого филума наибольшим сходством с выделенным изолятом обладали представители класса *Deltaproteobacteria*: *Dissulfurirhabdus thermomarina* SH388^T, *Dissulfuribacter thermophilus* S69^T и *Dissulfurimicrobium hydrothermale* Sh68^T (88.1, 87.4% и 85.7%).

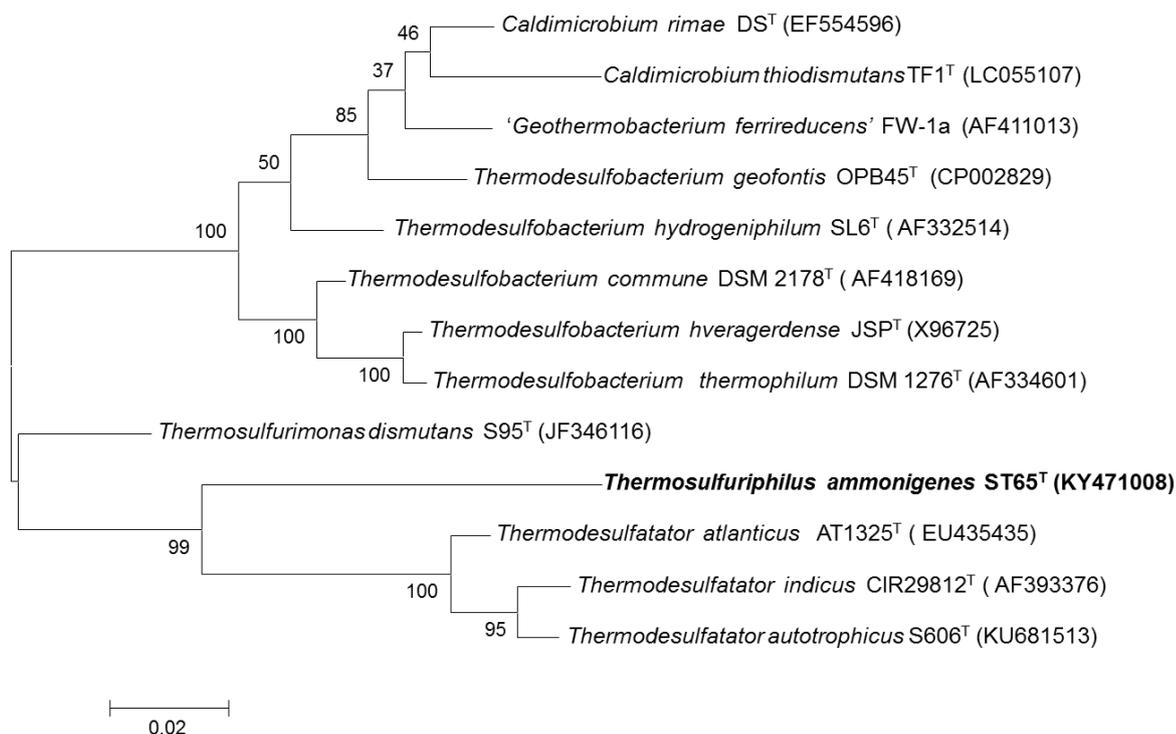


Рисунок 15. Дендрограмма, основанная на последовательности гена 16S рРНК, показывающая филогенетическое положение *Thermosulfuriphilus ammonigenes* ST65^T, масштабная линейка – 2% различия последовательностей.

В настоящее время в филум *Thermodesulfobacteria* входят четыре рода, содержащие виды с валидно-описанными именами. *Thermodesulfobacterium*, *Thermodesulfatator*, *Caldimicrobium* и *Thermosulfurimonas* и один невалидированный вид, ‘*Geothermobacterium ferrireducens*’. Основным отличием штамма ST65^T от представителей родов *Thermodesulfobacterium* и *Thermodesulfatator* является неспособность к сульфатредукции. В отличие от *Caldimicrobium rimae* ST65^T не растет органотрофно, и не способен восстанавливать Fe(III), как ‘*Geothermobacterium ferrireducens*’. В дополнение к значительной филогенетической отдаленности, штамм ST65^T отличается от близкородственных организмов рядом физиологических свойств, в том числе диапазоном температур и солености, содержанием геномной Г+Ц, профилем жирных кислот, а также неспособностью к железоредукции и утилизации водорода и тиосульфата. (Таблица 14).

На основании результатов филогенетического анализа и исследования физиологических свойств, мы предложили отнести штамм ST65^T к новому роду *Thermosulfuriphilus* в филуме *Thermodesulfobacteria* с типовым видом *Thermosulfuriphilus ammonigenes*.

Типовой и единственный штамм ST65^T депонирован в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) под номером DSM 102941^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером VKM B-2855^T.

Таблица 14. Дифференцирующие характеристики штамма ST65^T и наиболее близких видов

Штаммы **1**, ST65^T; **2**, *Thermosulfurimonas dismutans* S95^T (Slobodkin et al., 2012); **3**, *Thermodesulfatator atlanticus* AT1325^T (Alain et al., 2010); **4**, *Thermodesulfatator indicus* CIR29812^T (Moussard et al., 2004); **5**, *Dissulfurirhabdus thermomarina* SH388^T (Slobodkina et al., 2016); **6** *Dissulfuribacter thermophilus* S69^T (Slobodkin et al., 2013); **7**, *Dissulfurimicrobium hydrothermale* Sh68^T (Slobodkin et al., 2016).

Характеристика	1	2	3	4	5	6	7
Таксономическое положение	Филум <i>Thermodesulfobacteria</i>				Класс <i>Deltaproteobacteria</i>		
Источник выделения	Глубоководная морская гидротерма Тихий океан	Глубоководная морская гидротерма, Тихий океан	Глубоководная морская гидротерма, Атлантический океан	Глубоководная морская гидротерма, Индийский океан	Мелководная морская гидротерма, Тихий океан	Глубоководная морская гидротерма, Тихий океан	Наземная гидротерма, Камчатка
Температурный оптимум, °С	65	74	65-70	70	50	61	50-52
рН оптимум	6.5	7.0	6.5-7.5	6.25	6.0-6.5	6.8	6.0-6.2
Соленость среды	Морская	Морская	Морская	Морская	Морская	Морская	Пресная
Органотрофный рост	-	-	-	+	-	-	-
Восстановление SO ₄ ²⁻	-	-	+	+	-	-	-
Восстановление Fe(III)	-	-	нд	нд	-	+	-

Таблица 14 (окончание)

Восстановление NO_3^- аммонификация	+	+	-	-	-	+	-
Диспропорциониро вание S^0	+	+	нд	нд	+	+	+
Диспропорциониро ване $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	+	+	нд	нд	-	+	+
Рост с $\text{H}_2/\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	-	+	-	-	-	+	-
Основные жирные кислоты	$\text{C}_{16:0}$, $\text{C}_{18:1} \omega 7$	$\text{C}_{16:0}$, $\text{C}_{18:0}$, $\text{ai-C}_{17:0}$	$\text{C}_{16:0}$, $\text{C}_{18:1} \omega 7$, $\text{C}_{18:0}$	$\text{C}_{16:0}$, $\text{C}_{18:1}$, $\text{C}_{18:0}$	$\text{C}_{16:0}$, $\text{i-C}_{15:0}$,	$\text{C}_{16:0}$, $\text{C}_{18:1} \omega 7$, $\text{cyc-C}_{19:0}$	$\text{C}_{16:0}$, cyc- $\text{C}_{19:0}$, $\text{C}_{18:1}$ $\omega 5$, $\text{C}_{18:0}$
Г+Ц состав ДНК (мол%)	49.6	52.0	45.6	46.0	64.6	40.5	49.0

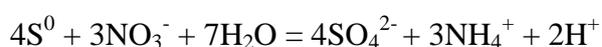
4.2.2. Диссимиляционное восстановление нитрата в аммоний с анаэробным окислением серы

Литоавтотрофные микроорганизмы, которые окисляют соединения серы с восстановлением нитрата, связывают биогеохимические циклы углерода, азота и серы в различных экосистемах. Микробное восстановление нитрата серой и мезофилами, и термофилами, происходит, как правило по пути денитрификации, реже идет до образования нитрита (Thamdrup and Dalsgaard, 2008; Shao et al., 2010). Серозависимая аммонификация нитрата до настоящего времени была продемонстрирована только для нескольких видов *Proteobacteria* с сульфидом в качестве донора электронов (Dannenberg et al., 1992, Eisenmann et al., 1995, Otte et al., 1999; Sayama et al., 2005; Hogslund et al., 2009). Микроорганизмы, способные сочетать рост с окислением элементарной серы и восстановлением нитрата до аммония, к началу нашей работы были неизвестны.

Штамм *Thermosulfuriphilus ammonicus* ST65^T был выделен на среде, содержащей серу и нитрат в качестве донора и акцептора электронов и рос с образованием аммония. Наиболее филогенетически близкородственными ему организмами оказались *Thermosulfurimonas dismutans* S95^T (филум *Thermodesulfobacteria*) и *Dissulfuribacter thermophilus* S69^T (класс *Deltaproteobacteria*), описанные ранее как диспропорционаторы серы и ее соединений (Slobodkin et al., 2012, 2013).

Культивирование этих организмов в среде, используемой для ST65^T, выявило, что они также способны к росту за счет серы и нитрата. Рост всех трех организмов сопровождался удалением нитрата и накоплением аммония и сульфата в среде (Рисунок 11). Конечная концентрация клеток достигала $1.7-2.1 \times 10^8$ кл./мл. Нитрат (10 мМ) потреблялся полностью с образованием 10 мМ аммония, нитрит или молекулярный азот в детектируемых количествах не образовывались. Единственным продуктом окисления серы был сульфат, образования сульфита или тиосульфата не детектировалось. В неинокулированных контролях концентрация нитрата не изменялась, и образования сульфата не происходило (Рисунок 16).

После потребления основной части нитрата (48-65 ч), в культурах детектировалось небольшое количество сульфида (0.8-0.9 мМ), указывающее на осуществление клетками процесса диспропорционирования серы. Количество сульфида было более, чем в 20 раз меньше количества образованного сульфата, что свидетельствует о том, что диспропорционирование играет минорную роль в энергетическом метаболизме всех трех микроорганизмов в данных условиях. Отношение образованного сульфата к потребленному нитрату составило 1.3-1.5. Такое отношение $\text{SO}_4^{2-}/\text{NO}_3^-$ близко к теоретическому отношению, согласно реакции:



$$[\text{SO}_4^{2-}/\text{NO}_3^- = 1.33].$$

Анализ полноразмерных геномных последовательностей *T. dismutans* и *D. thermophilus* показал, что в обоих организмах присутствуют гены (*narMADGH*), кодирующие комплекс нитрат-восстанавливающих белков Nar типа. У обоих организмов в этот комплекс входят периплазматические тетрагенмовый цитохром NarM и каталитическая субъединица NarA, а также цитоплазматический шаперон NarD. Нитратвосстанавливающий комплекс *T. dismutans* и *D. thermophilus* не содержит цитохрома NarC для переноса электронов, а имеет NarGH комплекс, состоящий из двух Fe/S белков, аналогично некоторым эpsilon-протеобактериям, например, *Wolinella succinogenes* (Kern & Simon, 2009). Дигемовый цитохром NarB у этих бактерий также отсутствует.

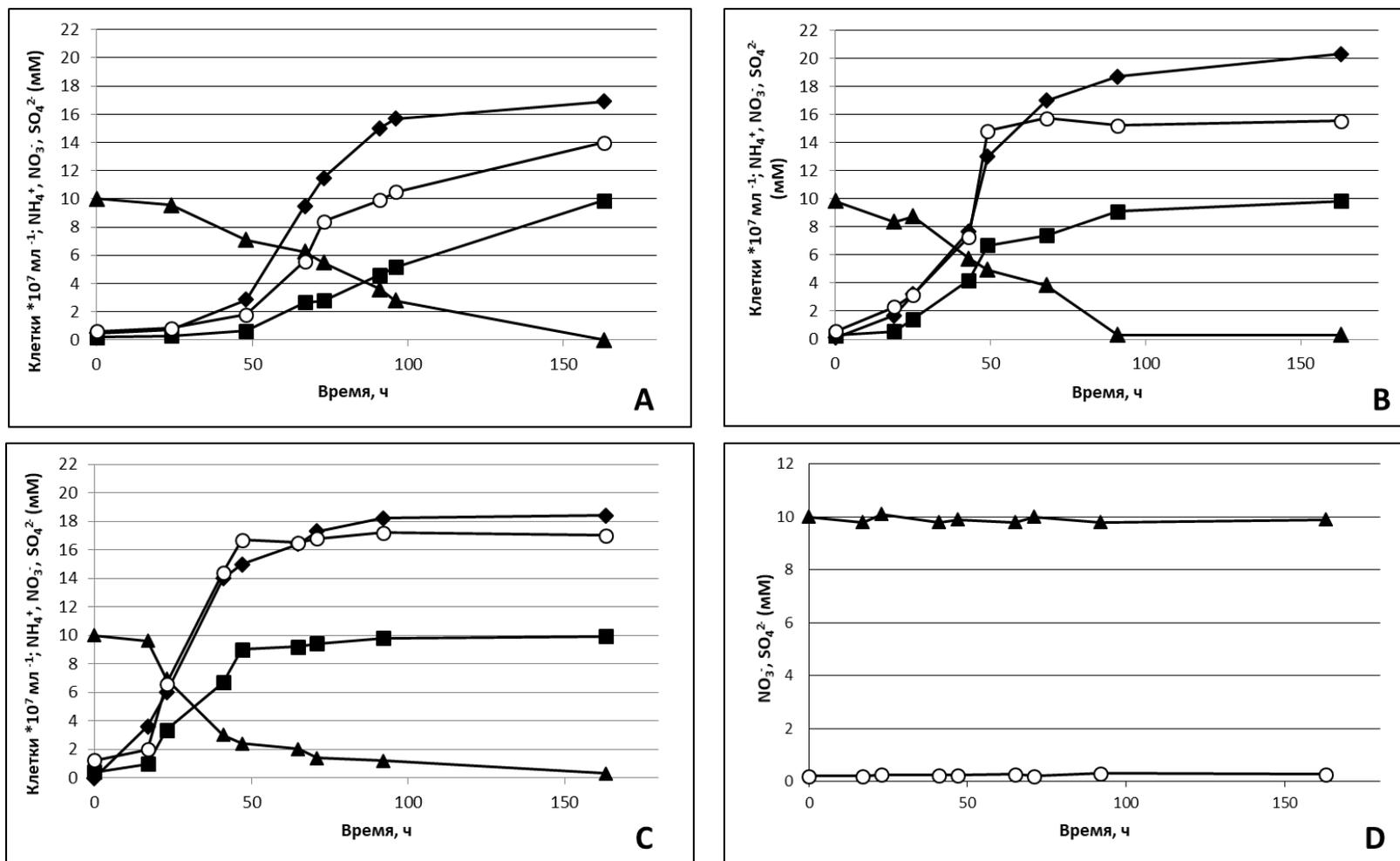


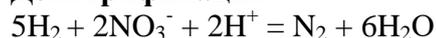
Рисунок 16. Рост *T. ammonigenes* ST65^T (A), *T. dismutans* S95^T (B) и *D. thermophilus* S69^T (C) в среде с элементарной серой и нитратом. (D), неинкулированный контроль. (◆) концентрация клеток (x10⁷/мл); концентрации (мМ) нитрата (▲), сульфата (○) и аммония (■).

Каким образом происходит дальнейшее восстановление образованного нитрита в аммоний не вполне ясно. Геномы обоих организмов не содержат гомологов ключевого фермента канонической аммоний-образующей нитрит-редуктазы - пентагемовой цитохром с редуктазы, NrfA. Можно предположить, что к восстановлению нитрита могут иметь отношение 4 гена, примыкающие к нитратредуктазному комплексу и образующие с ним кластер. Эти гены кодируют трансмембранный мультигемовый цитохром с, белок семейства NrfD, периплазматический железосерный белок и еще один трансмембранный цитохром с. Кроме того, геномы содержат ген октагемовой тетрационат-редуктазы, которая может быть вовлечена в восстановление нитрита (Simon et al., 2011), а также некоторые гены, гомологичные генам, предположительно участвующим в аммонификации у *Nautilia profundicola* (Campbell et al., 2009; Hanson et al., 2013).

Полученные результаты демонстрируют существование нового пути микробной трансформации неорганических соединений – анаэробного окисления элементной серы нитратом с образованием аммония. Бактерии, осуществляющие этот процесс, являются автотрофными термофилами, обитающими в глубоководных морских гидротермах, где аммонификация нитрата с серой может представлять ранее неизвестный путь первичной продукции. Также полученные данные расширили круг известных микроорганизмов, способных расти за счет анаэробного окисления серы, и впервые выявили эту способность у представителей классов *Thermodesulfobacteria* и *Deltaproteobacteria*, которые традиционно рассматривались как участники восстановительной части цикла серы.

Основным способом микробного диссимиляционного восстановления нитрата в природе считалась денитрификация. С термодинамической точки зрения, денитрификация дает больше свободной энергии в расчете на донор электронов. Однако различия в свободной энергии этих процессов нивелируются при расчетах на акцептор электронов в реакциях с серой или водородом в качестве донора электронов (Tiedje et al., 1982; Strohm et al., 2007).

Денитрификация



$$\Delta G^{\circ\prime} = -224.3 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ H}_2$$
$$\Delta G^{\circ\prime} = -560.33 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ NO}_3^-$$

$$\text{NO}_3^- / \text{H}_2 = 0.4$$



$$\Delta G^{\circ\prime} = -548.01 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ S}^0$$
$$\Delta G^{\circ\prime} = -456.7 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ NO}_3^-$$

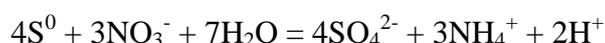
$$\text{NO}_3^- / \text{S}^0 = 1.2$$

Респираторная аммонификация



$$\Delta G^{\circ\prime} = -149.8 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ H}_2$$
$$\Delta G^{\circ\prime} = -599.0 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ NO}_3^-$$

$$\text{NO}_3^- / \text{H}_2 = 0.25$$



$$\Delta G^{\circ\prime} = -325.53 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ S}^0$$
$$\Delta G^{\circ\prime} = -434.0 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ NO}_3^-$$

$$\text{NO}_3^- / \text{S}^0 = 0.75$$

Опыты с чистыми культурами показали, что выход биомассы при росте бактерий, образующих аммоний из нитрата, выше, чем у денитрифицирующих (Strohm et al., 2007). В экспериментах с *Shewanella loihica* PV-4, способной к осуществлению обоих путей восстановления нитрата, было показано, что увеличение соотношения донор/акцептор приводит к переходу от денитрификации к аммонификации, вызванное снижением транскрипции генов денитрификации, *nirK* и *nosZ* (Yoon et al., 2015). Причина, по которой микроорганизмы используют аммонификацию вместо более энергетически выгодной денитрификации, до конца не выяснена. Возможным объяснением может быть то, что для аммонификации используется меньше нитрата на моль использованного донора, что может давать преимущества в экосистемах с более низким его содержанием (Tiedje et al., 1982; Yoon et al., 2015). Из этого следует, что диссимиляционная аммонификация может вносить существенный вклад в цикл азота, и ее значение в различных экосистемах может быть выше, чем ранее предполагалось.

Таким образом, в ходе исследования биоразнообразия литоавтотрофных анаэробных микроорганизмов, растущих в анаэробных условиях с окислением серы и восстановлением нитрата, были получены бактерии, представляющие новые таксоны и обладающие новыми физиологическими и метаболическими свойствами. Впервые показан процесс диссимиляционной аммонификации нитрата с серой в качестве донора электронов и выделены и охарактеризованы бактерии, осуществляющие его. Выделен также самый высокотемпературный анаэробный представитель *Gamma*proteobacteria.

ГЛАВА 5. НОВЫЕ ТЕРМОФИЛЬНЫЕ СУЛЬФИТВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ БАКТЕРИИ

Хемолитоавтотрофные микроорганизмы способны развиваться за счет различных неорганических источников энергии, которыми богаты зоны вулканизма и геотермальной активности. Одним из наиболее типичных и распространенных вулканических газов является сернистый газ (SO₂). Из-за высокой растворимости, в водных экотопах он обычно присутствует в виде сульфит-иона. Прокариоты, осуществляющие диссимиляционную сульфитредукцию, филогенетически разнородны и включают почти всех сульфатредукторов. Среди неспособных к восстановлению сульфата микроорганизмов известно всего несколько видов литоавтотрофных термофильных сульфитредукторов.

5.1. Выделение и характеристика новых таксонов сульфитредукторов

Для выделения анаэробных термофильных литоавтотрофных сульфитвосстанавливающих микроорганизмов использовали пробы осадка, воды и обрастаний, отобранных из наземных и мелководных морских гидротерм Кунашира и Камчатки (Таблица 4 в Главе 3 Материалы и методы). Филогенетический анализ на основе гена 16S рРНК полученных чистых культур выявил, что две выделенные бактерии (штаммы SH388 и SF97) являются представителями новых родов, относящихся к филумам *Proteobacteria* (класс *Deltaproteobacteria*) и *Firmicutes* (семейство *Thermoanaerobacteraceae*) со сходством генов 16S рРНК с ближайшими родственными организмами 92-93% (Таблица 15). Остальные чистые культуры представляют новые штаммы ранее описанных видов бактерий, принадлежащих родам *Ammonifex* (три из пяти штаммов), *Carboxydothemus* и *Caldimicrobium* с уровнем сходства генов 16S рРНК с ближайшими родственными организмами 99.3-99.7% (Таблица 15). Типовые штаммы видов *Ammonifex degensii*, *A. thiophilus*, *Carboxydothemus pertinax* и *Caldimicrobium rimae* не используют сульфит в качестве акцептора электронов для роста, хотя могут использовать различные другие соединения серы.

Таблица 15. Выделение чистых культур литоавтотрофных сульфитредукторов

Проба	Условия культивирования		Чистая культура, штамм	Ближайший родственный организм/ порядок	Сходство генов 16S рРНК (%)
	Т°С	Соленость среды			
38Н	50	Морская	SH388	<i>Dissulfuribacter thermophilus</i> / <i>class Deltaproteobacteria</i>	91.6
38Н	65	Морская	H384	<i>Caldimicrobium rimae</i> / <i>Thermodesulfobacteriales</i>	99.4
8	65	Пресная	82	<i>Ammonifex degensii</i> / <i>Thermoanaerobacterales</i>	99.3
9	65	Пресная	SF97	<i>Ammonifex thiophilus</i> / <i>Thermoanaerobacterales</i>	93.1
18	65	Пресная	184	<i>Ammonifex degensii</i> / <i>Thermoanaerobacterales</i>	99.3
M4	65	Пресная	M4	<i>Carboxydotherrmus pertinax</i> / <i>Thermoanaerobacterales</i>	99.7
M9	65	Пресная	M9	<i>Ammonifex thiophilus</i> / <i>Thermoanaerobacterales</i>	99.4

Два штамма термофильных литоавтотрофных бактерий, способных расти за счет восстановления сульфита водородом, были выделены, описаны и узаконены как новые таксоны (Таблица 16). Обладая сходным метаболизмом, они имеют лишь отдаленное филогенетическое родство и принадлежат к разным филумам.

Таблица 16. Таксономическое положение и местообитания новых литоавтотрофных сульфитвосстанавливающих бактерий

Организм, статус	Таксономическое положение*	Местообитание, описание образца
<i>Dissulfurirhabdus thermomarina</i> gen. nov., sp. nov.	<i>Proteobacteria</i> - <i>Deltaproteobacteria</i>	Мелководная морская гидротерма, о. Кунашир, Курильские острова, Россия
<i>Thermodesulfitimonas autotrophica</i> gen. nov., sp. nov.	<i>Firmicutes</i> – <i>Clostridia</i> - <i>Thermoanaerobacterales</i> - <i>Thermoanaerobacteraceae</i>	Горячий источник, кальдера Головнина, о. Кунашир, Курильские острова, Россия

*List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. (<http://www.bacterio.net>)

Dissulfurirhabdus thermomarina SH388^T gen. nov., sp. nov.

Штамм SH388^T был выделен из пробы песка, гидротермального флюида и морской воды из мелководной морской гидротермы, расположенной на глубине 12 м и на расстоянии 200-250 м от берега (44° 29.469' N, 146° 06.247' E), о. Кунашир (Курильские острова, Россия). Температура и pH в месте отбора пробы варьировали в пределах 60-84°C и 6.0-6.5. Образцы были отобраны анаэробно в плотно закрытые флаконы и хранились при +4°C до начала работы.

Морфология клеток. Клетки нового изолята представляли собой прямые палочки 0.2-0.4 мкм в диаметре и длиной 1.0-2.5 мкм (Рисунок 17а), растущие одиночно или в парах. Клетки были подвижны благодаря одному полярному жгутику. Формирования спор не наблюдалось. Ультратонкие срезы штамма SH388^T выявили грамотрицательный тип клеточной стенки с внешней мембраной (Рисунок 17б).

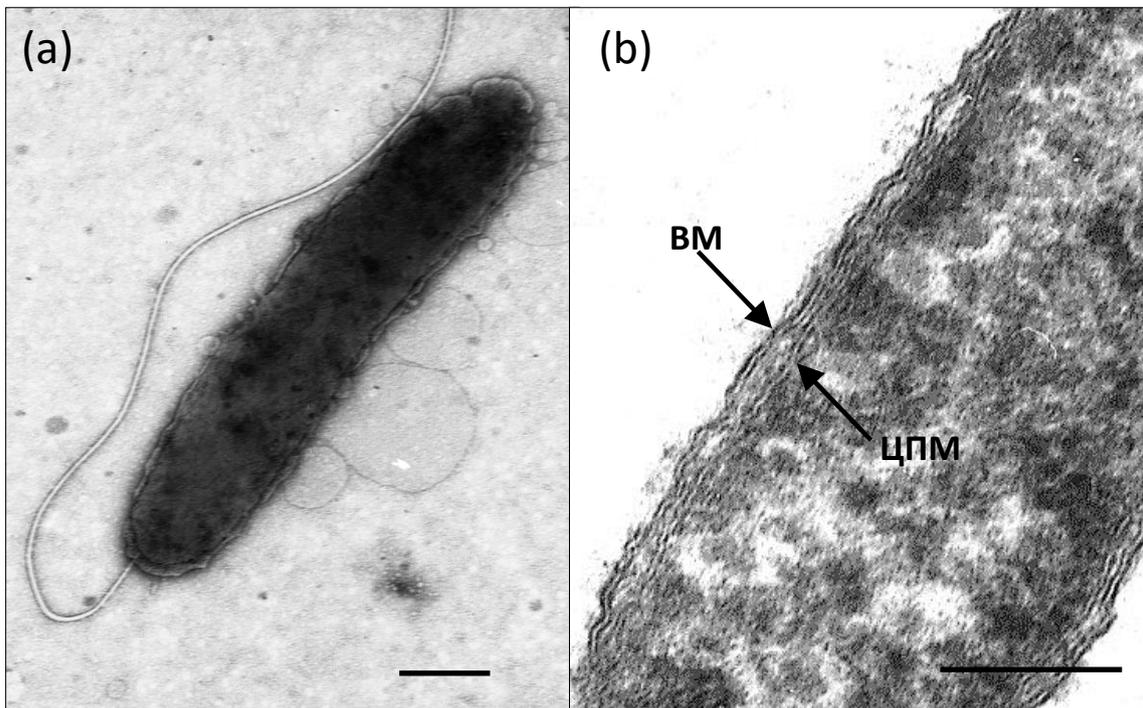


Рисунок 17. Морфология клетки штамма SH388^T. (а) Электронная микрография негативно окрашенных клеток штамма, показывающая морфологию клетки и положение жгутика; (б) Ультратонкий срез, показывающий строение клеточной стенки. ЦПМ, цитоплазматическая мембрана, BM, внешняя мембрана. Масштабная линейка, 0.2 мкм.

Физиологические характеристики. Температурный диапазон роста штамма SH388^T составлял 25-58°C с оптимумом при 50°C. Роста не наблюдалось при 60°C и выше в течение 3х недель инкубации. Диапазон pH составлял 5.0-7.0 с оптимумом при pH 6.0-6.5. Роста не было при pH 4.5 и ниже и 7.5 и выше. Штамм рос при концентрации NaCl от 0.5 до 4.0% (вес/об.) с оптимумом при 2.0-2.5% (вес/об.) и не рос при 0.4% (вес/об.) и ниже или при 4.5% (вес/об.) и выше.

Штамм SH388^T рос хемолитоавтотрофно с водородом и сульфитом в качестве донора и акцептора электронов и HCO₃⁻/CO₂ в качестве источника углерода. Замена сульфита на сернистый газ (SO₂/CO₂ (15:85 (об.) в газовой фазе) не влияла на скорость роста и конечную концентрацию клеток. Восстановление сульфита или SO₂ сопровождалось потреблением водорода и образованием сульфида, наличие ферригидрита в среде не было обязательным. В отсутствие водорода штамм мог расти за счет диспропорционирования сульфита (5мМ), сернистого газа (SO₂/CO₂ (15:85 (об.) в газовой фазе) и элементарной серы (5 г/л), но не тиосульфата (15 мМ). В этом случае рост сопровождался образованием сульфата и превращением ферригидрита в черный немагнитный осадок, указывающий на образование сульфида. Для диспропорционирования серы наличие ферригидрита было необходимо, диспропорционирование сульфита и сернистого газа могло протекать и без него. Добавление пирувата, малата (10 мМ каждого), глюкозы, фруктозы или сахарозы (2.0 г/л каждого) в среду с сульфитом натрия слегка увеличивало скорость роста, но не увеличивало конечную концентрацию клеток. Ацетат, пропионат, бутират, формиат, метанол, этанол, пропанол, изо-пропанол, лактат, фумарат, сукцинат, глицерин (10 мМ каждого), пептон или дрожжевой экстракт (2.0 г/л каждого) не стимулировали рост штамма с сульфитом. Изолят не рос и не восстанавливал сульфат (14 мМ), нитрат (10 мМ) или ферригидрит (90 ммоль Fe(III)/л) с водородом (H₂/CO₂ (80:20 (об.)), ацетатом, лактатом, пируватом, сукцинатом, этанолом (10 мМ каждого) или пептоном (2.0 г/л). Он также не рос и не восстанавливал элементарную серу (5.0 г/л), тиосульфат (15 мМ), фумарат, АХДС (10 мМ каждого) или кислород (2.0 или 20%

(об.) в газовой фазе) с водородом как донором электронов. Изолят не рос за счет окисления элементарной серы (5.0 г/л) или тиосульфата (15 мМ) нитратом (10 мМ) или кислородом (2.0 или 20% (об.) в газовой фазе). Штамм SH388^T не рос аэробно с ацетатом, пируватом, сукцинатом (10 мМ каждого), глюкозой, фруктозой, мальтозой, сахарозой, арабинозой или пептоном (2.0 г/л каждого) и не сбрасывал эти субстраты в анаэробных условиях.

Хемотаксономический анализ. Жирные кислоты представляли собой смесь насыщенных и мононенасыщенных прямоцепочечных и разветвленных кислот. Основными были i-C_{15:0} и C_{16:0} (32.4 и 23.2%, соответственно), с меньшими количествами C_{18:1} ω7 (7.8 %), i-C_{17:1} ω8 (6.8 %), C_{17:1} ω6 (6.0%) и C_{14:0} (5.7 %). Другие жирные кислоты присутствовали в следовых количествах (менее 5% общего содержания жирных кислот). Содержание Г+Ц в геномной ДНК штамма SH388^T – 64.6 мол% (T_m).

Филогенетический анализ. Сравнение 1521 п.н. последовательности гена 16S рРНК с базами данных GenBank и EzTaxon показало, что штамм SH388^T принадлежит классу *Deltaproteobacteria* (Рисунок 18). Штамм имеет наибольшее сходство с *Dissulfuribacter thermophilus* S69^T (91.6%) и *Dissulfurimicrobium hydrothermale* Sh68^T (90.4%) которые из-за большой филогенетической отдаленности и фенотипических различий не отнесены ни к одному из семейств или порядков класса *Deltaproteobacteria*. Сходство с видами других порядков этого класса, *Syntrophobacterales*, *Desulfobacterales* and *Desulfuromonadales* не превышало 89%.

Диспропорционирование соединений серы позволяет клетке получать энергию для роста за счёт использования лишь одного простого соединения в качестве как донора, так и акцептора электронов. Штамм SH388^T - первый термофильный диспропорционатор соединений серы, выделенный из мелководной гидротермальной экосистемы, где он участвует в биогеохимическом цикле серы как первичный продуцент. Известные ранее термофильные бактерии, диспропорционирующие серу, были выделены из

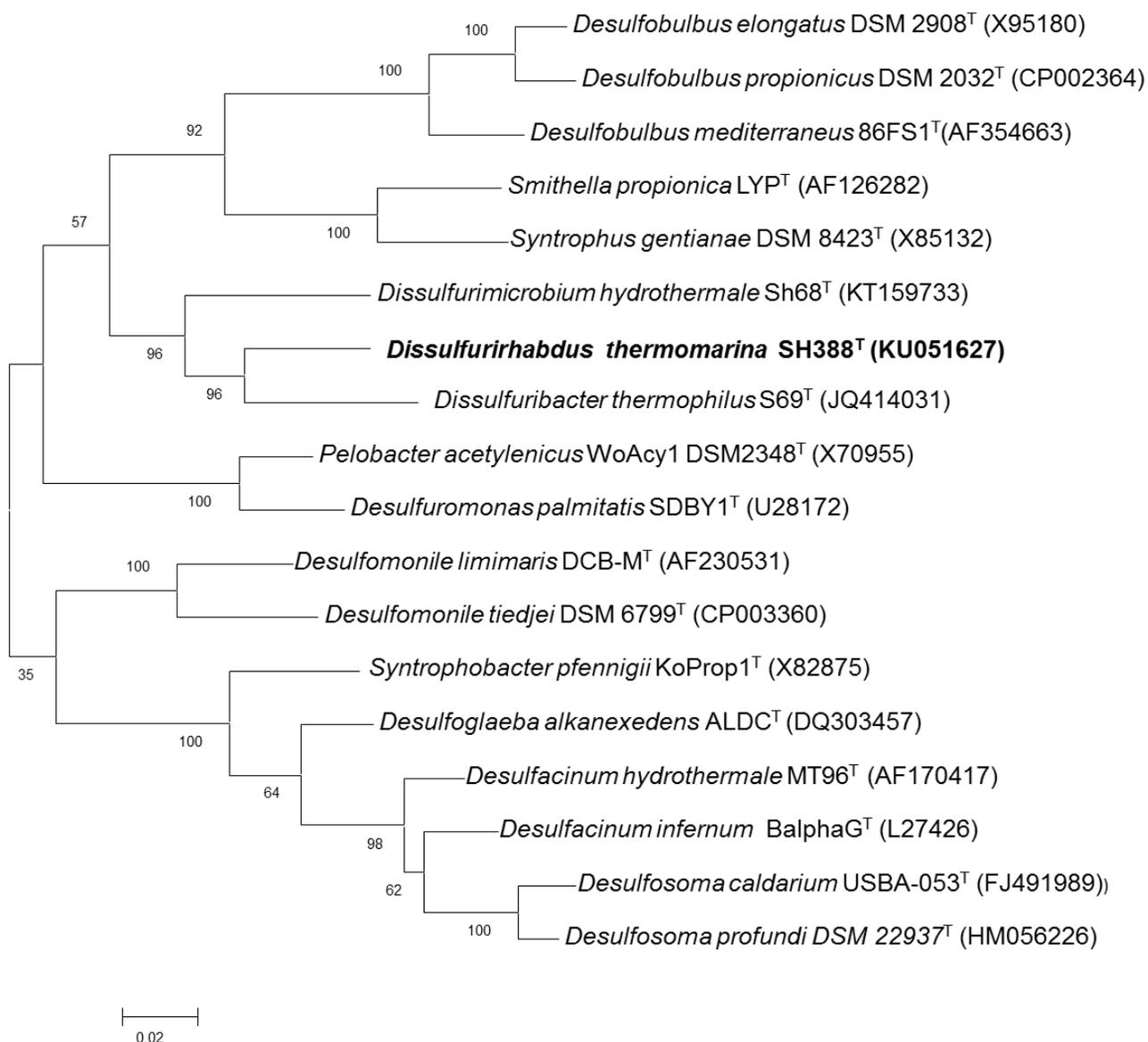


Рисунок 18. Дендрограмма, основанная на последовательности гена 16S рНК, показывающая филогенетическое положение *Dissulfurirhabdus thermomarina* SH388^T, масштабная линейка – 2% различия последовательностей.

глубоководных и наземной гидротерм. Новый организм обладает общими с наиболее близкородственными видами отличительными свойствами: способностью к диспропорционированию соединений серы при повышенных температурах и неспособностью к диссимиляционной сульфат-редукции. В дополнение к значительной

филогенетической удаленности, штамм SH388^T отличается от родственных штаммов содержанием Г+Ц в геномной ДНК, профилем жирных кислот, а также некоторыми физиологическими характеристиками (Таблица 14).

На основании результатов анализа филогенетического положения и исследования физиологических свойств, мы предложили отнести штамм SH388^T к новому роду *Dissulfurirhabdus* в классе *Deltaproteobacteria* с типовым видом *Dissulfurirhabdus thermomarina*.

Типовой и единственный штамм SH388^T депонирован в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) под номером DSM 100025^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером VKM B-2960^T.

***Thermodesulfitimonas autotrophica* SF97^T gen. nov., sp. nov.**

Штамм SF97^T был выделен из пробы осадка и воды, отобранной из горячего источника в кальдере Головнина о. Кунашир (Курильские острова, Россия). Температура и pH в месте отбора пробы (43° 51.857' N 145° 30.084' E) были 67°C и 6.0, соответственно. Образцы были отобраны анаэробно в плотно закрытые флаконы и хранились при +4°C до начала работы.

Морфология клеток. Клетки нового изолята представляли собой прямые палочки 0.5-0.6 мкм в диаметре и длиной 1.0-2.0 мкм (Рисунок 19а), растущие одиночно, в парах или образуя короткие цепочки из 5-10 клеток. Клетки были подвижны благодаря латеральному жгутикованию, до 4 жгутиков на клетку. Ультратонкие срезы штамма SH388^T выявили грамположительный тип клеточной стенки (Рисунок 19б). Формирования спор при культивировании в оптимальных и неоптимальных условиях (различные температура, pH и соленость среды) не наблюдалось. Кроме того, культуры, прогретые при 100°C в течение 20 мин или при 121°C в течение часа, теряли способность к росту, что предполагает отсутствие теплоустойчивых спор.

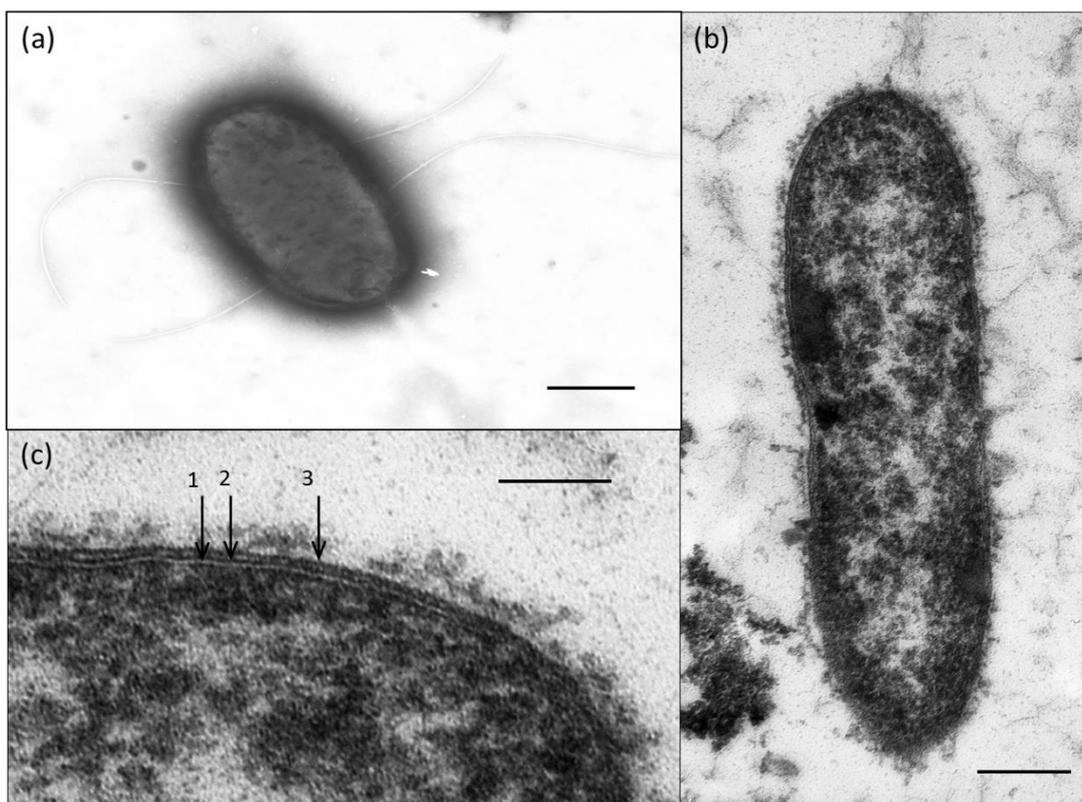


Рисунок 19. Морфология клетки штамма SF97^T. (a) Электронная микрография негативно окрашенных клеток штамма, показывающая морфологию клетки и положение жгутиков; (b) Ультратонкий срез, показывающий строение клеточной стенки. Масштабная линейка, 0.3 мкм. (c) увеличенное изображение (b), показывающее ультраструктуру клеточной стенки с цитоплазматической мембраной (1), электрон-плотным слоем, прилегающим к мембране (2) и внешним слоем клеточной стенки (3). Масштабная линейка, 0.1 мкм.

Физиологические характеристики. Температурный диапазон роста штамма SF97^T составлял 45-72°C с оптимумом при 65°C. Роста не наблюдалось при 42°C и ниже и при 75°C и выше в течение 3х недель инкубации. Диапазон pH составлял 5.0-8.5 с оптимумом при pH 6.0-6.5. Роста не было при pH 5.0 и ниже и 8.8 и выше. Штамм SF97^T не нуждался в NaCl для роста, и оптимум роста наблюдался в его отсутствие, однако он мог расти при концентрации NaCl до 1.0% (вес/об.). При концентрации NaCl 1.5% (вес/об.) и выше роста не наблюдалось.

Штамм SF97^T рос хемолитоавтотрофно с водородом и сульфитом в качестве донора и акцептора электронов и HCO₃⁻/CO₂ в качестве источника углерода. Время удвоения при оптимальных условиях составляло около 3.7 часа. Конечная концентрация клеток была в пределах 4.0-6.0x10⁷ кл./мл. Замена сульфита на сернистый газ (SO₂/CO₂ (15:85 (об.) в

газовой фазе) не влияла на скорость роста и конечную концентрацию клеток. Восстановление сульфита или SO_2 сопровождалось потреблением водорода и образованием сульфида, наличие ферригидрита в среде не было обязательным. Потенциальные доноры электронов проверяли с сульфитом в качестве акцептора. Штамм использовал формиат (10 мМ) и не рос с CO (5 или 100% (об.) в газовой фазе), метиламином, диметиламином, триметиламином (5 мМ каждого), ацетатом, пропионатом, бутиратом, метанолом, этанолом (10 мМ каждого), глицерином, глюкозой, фруктозой (2 г/л каждого), лактатом, пируватом, фумаратом, малатом, оксалатом, сукцинатом (10 мМ каждого), дрожжевым экстрактом или пептоном (2.0 г/л каждого). В присутствии водорода или формиата, CO_2 и сульфита лаг-фаза укорачивалась при добавлении в среду малата или пирувата (10 мМ каждого), конечная концентрация клеток не изменялась. Добавление глюкозы, пептона (2.0 г/л каждого) или дрожжевого экстракта (0.2 г/л) не оказывало влияния на рост культуры. Новый изолят не рос и не восстанавливал сульфат (14 мМ), элементную серу (5 г/л) или ферригидрит (90 ммоль/л Fe(III)) с водородом H_2/CO_2 (80:20 (об.)), формиатом, ацетатом, лактатом, пируватом, этанолом (10 мМ каждого) или пептоном (2.0 г/л). Он также не рос и не восстанавливал нитрат (10 мМ), нитрит (2.5 мМ), тиосульфат (15 мМ), фумарат (10 мМ) или кислород (2.0 или 20% (об.) в газовой фазе) с водородом или формиатом в качестве донора электронов. Штамм не рос, окисляя элементную серу (5 г/л), тиосульфат (15 мМ) или сульфит (5 мМ) с нитратом (10 мМ) или кислородом (2.0 или 20% (об.) в газовой фазе). Штамм SF97^T не диспропорционировал элементную серу (5 г/л), тиосульфат (15 мМ) или сульфит (5 мМ) независимо от наличия в среде ферригидрита как сульфидсвязывающего агента.

Хемотаксономический анализ. Анализ жирных кислот выявил доминирование $\text{C}_{16:0}$ (56,2%) с меньшими количествами $\text{C}_{18:0}$ (14,9%), $i\text{-C}_{16:0}$ (8,2%) и $ai\text{-C}_{15:0}$ (7,7%). Другие жирные кислоты присутствовали в следовых количествах (менее 5% общего содержания жирных кислот). Содержание Г+Ц в геномной ДНК штамма SF97^T – 55,8 мол% (T_m).

Филогенетический анализ. Сравнение 1427 п.н. последовательности гена 16S рРНК с базами данных GenBank и EzTaxon показало, что штамм SF97^T принадлежит семейству *Thermoanaerobacteraceae*, филум *Firmicutes* (Рисунок 20). Наибольшее сходство генов 16S рРНК штамм имел с *Ammonifex thiophilus* (93.3 %) и *Ammonifex degensii* (92.7 %). Представители других родов филума *Firmicutes* имели лишь отдаленное родство (менее 90% сходства генов 16S рРНК) с новым изолятом.

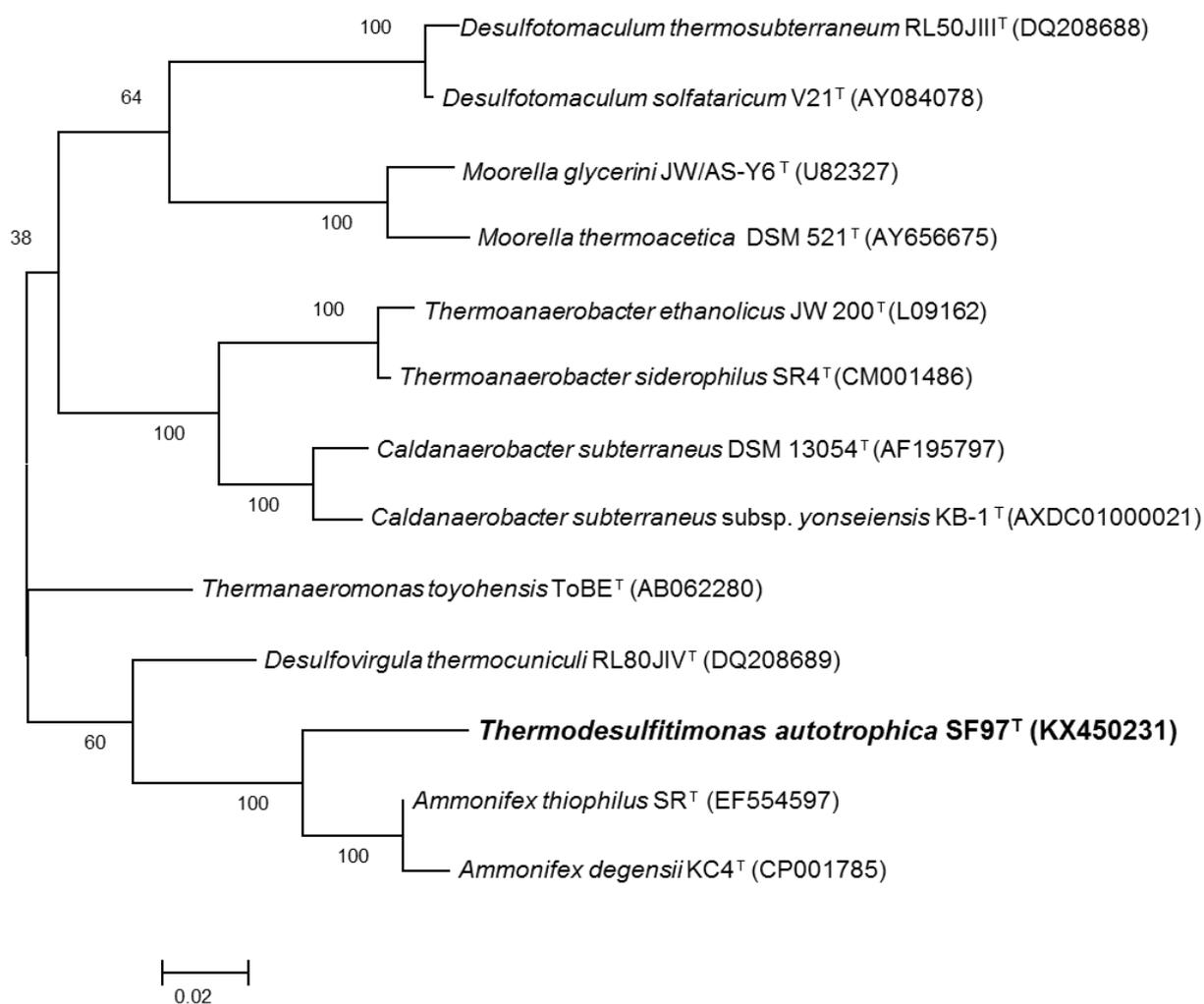


Рисунок 20. Дендрограмма, основанная на последовательности гена 16S рРНК, показывающая филогенетическое положение *Thermodesulfitimonas autotrophica* SF97^T, масштабная линейка – 2% различия последовательностей.

В семейство *Thermoanaerobacteraceae* входят термофильные строго-анаэробные бактерии, выделенные преимущественно из наземных горячих источников, подземных экотопов - шахт, месторождений нефти и газа, и антропогенных местообитаний. Семейство включает в себя, главным образом, гетеротрофов с бродильным типом метаболизма, использующих углеводы, но также несколько видов литоавтотрофных бактерий (Stackebrandt, 2013). Штамм SF97^T так же, как наиболее близкородственные виды рода *Ammonifex*, является палочковидной нейтрофильной хемолитоавтотрофной бактерией, выделенной из наземной гидротермы, использующей водород или формиат в качестве донора электронов (Таблица 17). Основным физиологическим отличием от рода *Ammonifex* является способность к диссимиляционному восстановлению сульфита и неспособность к сульфатредукции. Микроорганизмы, способные к восстановлению сульфита, филогенетически разнородны и включают в себя, за некоторыми исключениями, всех сульфатредукторов. Среди неспособных к сульфатредукции прокариот большинство используют органические доноры электронов для восстановления SO₃²⁻. Способность расти хемолитоавтотрофно, связанная с диссимиляционным восстановлением сульфита и использованием неорганических соединений, таких как водород или монооксид углерода, показана для бактерий *Sulfurihydrogenibium azorense* и *Calderihabitans maritimus*, а также для архей *Archaeoglobus veneficus* и *Pyrobaculum islandicum* (Aguilar et al., 2004; Yoneda et al., 2013; Huber et al., 1997; Huber et al., 1987). Все эти организмы, в отличие от штамма SF97^T, могут использовать альтернативные акцепторы электронов. Таким образом, штамм SF97^T является первым облигатным сульфитвосстанавливающим микроорганизмом.

На основании результатов анализа филогенетического положения и исследования физиологических свойств, мы предложили отнести штамм SF97^T к новому роду *Thermodesulfitimonas* семейства *Thermoanaerobacteraceae* с типовым видом *Thermodesulfitimonas autotrophica*.

Типовой и единственный штамм SF97^T депонирован в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) под номером DSM 102936^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером VKM В-2961^T.

Таблица 17. Сравнительные характеристики штамма SF97^T и близкородственных видов

Характеристика	<i>Thermodesulfitimonas autotrophica</i> SF97 ^T	<i>Ammonifex thiophilus</i>	<i>Ammonifex degensii</i>
Источник выделения	Горячий источник, кальдера Головнина, Кунашир, Россия	Горячий источник, кратер Kawah Candradimuka, Ява, Индонезия	Горячий источник, кальдера Узон, Камчатка, Россия
Споры	-	-	+
Температура роста, °С, мин-(опт)-макс	45-(65)-72	57-(70)-77	60-(75)-82
рН роста, мин-(опт)-макс	5.5-(6.0-6.5)-8.5	5.0-(7.5)-8.0	6.0-(6.8)-7.5
Акцептор электронов			
сульфат	-	+	+/-
тиосульфат	-	-	+
сульфит	+	-	-
элементная сера	-	+	+/-
нитрат	-	+	-
Брожение с пируватом	-	+	-
Состав Г+Ц (мол.%)	55.8	54.0	56.2

В базе данных GenBank оказалась лишь одна последовательность гена 16S рРНК (номер в GenBank KX170880), имеющая сходство 96% с *Dissulfurirhabdus thermomarina*. В отличие от *D. thermomarina*, обитающего в морской экосистеме, этот флотип был детектирован в почве ризосферы рогоза узколистного в Индии. Другие наиболее близкие последовательности имели 92-93% сходства генов 16S рРНК и были детектированы в гидротермах в Тихом океане, в районах Гуаймас (Калифорнийский залив) и хребта Хуан де Фука. *Thermodesulfitimonas autotrophica*, согласно базе данных, на данный момент не имеет родственных организмов, со сходством генов 16S рРНК выше 95%. Наиболее близкие последовательности генов 16S рРНК, имеющие 94-95% сходства, были детектированы в глубоководных гидротермах в районе хребта Хуан де Фука (Тихий океан) и, вероятно, относятся к другому роду.

Таким образом, в результате изучения биоразнообразия литоавтотрофных анаэробных микроорганизмов, способных к восстановлению сульфита, были выделены и охарактеризованы новые термофильные бактерии, способные расти только за счет использования вулканических газов: H_2 , SO_2 и CO_2 , а также первый облигатный сульфитредуцирующий микроорганизм. Оба организма используют серу и/или ее соединения в качестве акцептора или донора электронов и участвуют и окислительной, и в восстановительной ветвях цикла. Диссимиляционный метаболизм соединений серы считается одним из наиболее ранних процессов, способных поддерживать жизнь. В случае с SO_2 , имеющим, в отличие от других соединений серы, прямое вулканическое происхождение, такой процесс имеет особенно важное значение для первичной продукции органического вещества в современных и древних биотопах.

ГЛАВА 6. НОВЫЕ ТЕРМОФИЛЬНЫЕ ЖЕЛЕЗОВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ

ПРОКАРИОТЫ

6.1. Выделение и характеристика новых таксонов железоредукторов

Для получения культур, восстанавливающих железо или марганец, использовали воду и осадки из горячих источников. Камчатки и фрагменты гидротермальных построек поля Ашадзе Срединно-Атлантического Хребта и гидротермальных полей бассейна Лау, относящегося к задуговому спрединговому центру юго-западной части Тихого океана (Таблица 5 в Главе 3 Материалы и методы). Филогенетический анализ на основе гена 16S рРНК полученных чистых культур выявил, что штамм S3R1 является представителем нового рода, относящегося к филуму *Proteobacteria* (класс *Deltaproteobacteria*) со сходством генов 16S рРНК с ближайшим родственным организмом 86% (Таблица 18). Штаммы S1860 и SBH6 принадлежат родам гипертермофильных архей *Pyrobaculum* и *Geoglobus*, соответственно, со сходством генов 16S рРНК с ближайшими родственными организмами 99 и 97%. Штаммы SL50 и SL61 принадлежат бактериальным родам *Deferribacter* и *Carboxydocella*, сходство генов 16S рРНК с ближайшими родственными организмами составляет около 97%. Остальные чистые культуры представляют новые штаммы ранее описанных видов бактерий, принадлежащих семействам *Thermococcaceae*, *Thermotogaceae* и *Thermoanaerobacteraceae* (уровень сходства генов 16S рРНК с ближайшими родственными организмами 97-99%). Железоредукторы известны среди представителей всех этих таксонов. Кроме железовосстанавливающих бактерий были выделены члены семейства *Thermaceae*, не способные восстанавливать Fe(III).

Таблица 18. Чистые культуры, выделенные из накопительных, восстанавливающих железо или марганец

Проба	Условия культивирования			Чистая культура, штамм	Ближайший родственный организм/ порядок	Сходство генов 16S рРНК (%)
	Т°С	Соленость среды	Донор электронов			
Восстановление Fe(III)						
1864	65	пресная	ацетат	1864-7a	<i>Thermoanaerobacter siderophilus</i>	97
1860	80	пресная	ацетат	S1860	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	99
Ch2	65	морская	ацетат	B265	<i>Vulcanithermus mediatlanticus</i>	98
Ch2	65	морская	ацетат	SBH6	<i>Geoglobus ahangari</i>	97
Ch 3	50	морская	лактат	SL50	<i>Deferribacter abyssi.</i>	97.
Ch3	85	морская	лактат	385	<i>Thermococcus mexicalis</i>	98
9R1	50	морская	альгинат	TM-50	<i>Marinitoga piezophila</i>	98
3R1	50	морская	альгинат	S3R1	<i>Desulfuromonas palmitatis</i>	86
18R1	65	морская	альгинат	18R-50	<i>Thermosipho atlanticus</i>	98
3R3	80	морская	альгинат	3R3-80	<i>Thermococcus aggregans</i>	99
Восстановление Mn(IV)						
1861	60	пресная	лактат	SL61	<i>'Carboxydocella ferrireducens'</i>	97
1864	65	пресная	ацетат	SAN64	<i>Thermus oshimaii</i>	99
Mar	50	морская	ацетат	Ac8	<i>Oceanithermus profundus</i>	99

Пять штаммов термофильных железовосстанавливающих прокариот, выделенных из наземных горячих источников и морских глубоководных гидротерм, были описаны и узаконены как новые таксоны (Таблица 19).

Таблица 19. Таксономическое положение и местообитания новых железоредукторов.

Организм, статус	Таксономическое положение	Местообитание
<i>Pyrobaculum ferrireducens</i> sp. nov.	<i>Crenarchaeota-Thermoprotei-Thermoproteales-Thermoproteaceae</i>	Гидротермальный источник, кальдера Узон, Камчатка
<i>Carboxydocella manganica</i> sp. nov.	<i>Firmicutes-Clostridia-Clostridiales</i>	Гидротермальный источник, кальдера Узон, Камчатка
<i>Geoglobus acetivorans</i> sp. nov.	<i>Euryarchaeota-Archaeoglobi-Archaeoglobales-Archaeoglobaceae</i>	Глубоководная гидротермальная постройка (Ашадзе) Срединно-Атлантический хребет
<i>Deferribacter autotrophicus</i> sp. nov.	<i>Deferribacteres-Deferribacteres-Deferribacterales-Deferribacteraceae</i>	Глубоководная гидротермальная постройка (Ашадзе) Срединно-Атлантический хребет
<i>Deferrisoma camini</i> gen. nov. sp. nov.	<i>Proteobacteria-Deltaproteobacteria</i>	Глубоководная гидротермальная постройка (АВЕ) Лау Спрединг центр, Тихий океан

*List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature .(<http://www.bacterio.net>)

***Pyrobaculum ferrireducens* 1860^T sp. nov.**

Штамм 1860^T был выделен из пробы 1860 воды и осадка, отобранной в сентябре 2008 года на гидротермальном поле Фумарольное, Узон, Камчатка (54° 30.115' N 159° 59.279' E). Образцы отбирали анаэробно в плотно закрывающиеся флаконы, транспортировали в лабораторию и хранили при +4°C до начала работы.

Морфология клеток. Клетки штамма представляли собой неподвижные прямые палочки 0.5 толщиной и 1.5-5.0 мкм длиной (Рисунок 21a). Негативно окрашенные электронные микрографии показали, что клеточная стенка состоит из типичного для архей белкового S-слоя (Рисунок 21b).

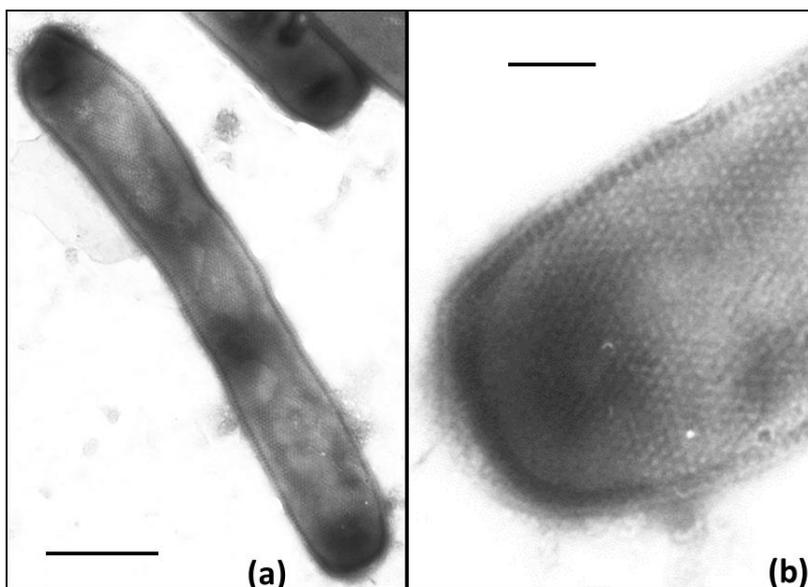


Рисунок 21. Электронные микрографии негативно окрашенных клеток штамма 1860^T. (a) общая морфология клетки, масштабная линейка, 0.5 мкм; (b) внешний слой поверхности клетки (S-слой), масштабная линейка, 0.1 мкм.

Физиологические характеристики. Температурный диапазон роста штамма 1860^T составлял 75-98°C с оптимумом при 90-95°C. Роста не наблюдалось при 100°C и выше и при 72°C и ниже в течение 3х недель инкубации. Диапазон pH составлял 5.5-7.5 с оптимумом при pH 6.0-7.0. Роста не было при pH 5.0 и ниже и 8.0 и выше. Оптимальный рост штамма 1860^T наблюдался в отсутствие NaCl, однако штамм мог расти при концентрации NaCl до 1.0 % (вес/об.). Роста не было при концентрации NaCl 1.5% и выше. Время удвоения в оптимальных условиях составляло 3 часа.

Штамм 1860^T рос гетеротрофно со сложными белковыми субстратами такими как пептон, дрожжевой экстракт и триптон (2.0 г/л каждого), в качестве донора электронов и ферригидритом (90 ммоль Fe(III)/л) или нитратом (10 mM) в качестве акцептора в присутствии 0.2 г/л дрожжевого экстракта. Не наблюдалось использования глюкозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, крахмала (2.0 г/л каждого), этанола (20 mM), формиата, ацетата, лактата, пирувата, малата или пропионата (10 mM каждого) в присутствии 50 мг/л

дрожжевого экстракта как с нитратом (10 мМ) в качестве акцептора электронов, так и без него. Штамм не рос литотрофно с H_2/CO_2 (80/20 (об.)), формиатом или тиосульфатом (10 мМ каждого) в качестве донора электронов и ферригидритом или нитратом в качестве акцептора, независимо от наличия или отсутствия 50 мг/л дрожжевого экстракта. С дрожжевым экстрактом (2.0 г/л) в качестве донора электронов изолят рос и восстанавливал ферригидрит (90 ммоль Fe(III)/л), Fe(III) цитрат (10 мМ), тиосульфат (20 мМ), нитрат, селенит, селенат (10 мМ каждого) и арсенат (5 мМ). Сульфат (14 мМ), сульфит (5 мМ), элементная сера (10 г/л), нитрит (2.5 мМ), фумарат и АХДС (10 мМ каждого) не восстанавливались и не поддерживали рост. Штамм также не рос в отсутствие добавленного акцептора электронов. Ферригидрит восстанавливался в черный магнитный осадок с содержанием Fe(II) 25-30 мМ; при восстановлении цитрата железа образовывалось 5-7 мМ Fe(II). В неинокулированных контролях никаких изменений цвета и объема осадка не происходило в течение всего периода инкубации. При росте с нитратом, в среде детектировалось накопление нитрита. Тиосульфат восстанавливался в сульфид. При росте с селенитом и селенатом происходило образование розового или черного осадка, соответственно, в поздней экспоненциальной или стационарной фазе роста, указывая на продукцию различных форм элементного селена. Штамм 1860^T не рос при добавлении кислорода (0.5, 2.0 или 5.0% об.) в газовую фазу или в аэробно приготовленной среде.

Характеристики ДНК и филогенетический анализ. Содержание Г+Ц в геномной ДНК штамма 1860^T – 56.97 мол% (геном).

Размер гена 16S рРНК составил 3600 п.н., из которых экзоны составляли 1499 п.н., а остальные принадлежали трем интронам. Наличие интронов в генах 16S рРНК - довольно распространенное явление в семействе *Thermoproteaceae* (Itoh et al., 2003), и очень редкое у других архей и бактерий (Salman et al., 2012). Нуклеотидная последовательность экзонов гена 16S рРНК изолята 1860^T была очень близка (97.9-98.7 % сходства) к последовательностям видов рода *Pyrobaculum* семейства *Thermoproteaceae*. Среди видов

других родов этого семейства наиболее близкими оказались *Thermoproteus tenax* и *Thermoproteus uzoniensis* (96% сходства), сходство с генами 16S рРНК других членов семейства составило 88-93%. Таким образом, штамм 1860^T филогенетически относится к роду *Pyrobaculum* (Рисунок 22). Наличие и доступность полноразмерных геномов штамма 1860^T и практически всех видов рода *Pyrobaculum*, позволили провести *in silico* гибридизацию. Результаты такой гибридизации показали, что сходство геномов 1860^T и видов *Pyrobaculum* с валидированными именами не превышает 19% (при пороговом критерии 70%). Средняя нуклеотидная идентичность (ANI) генов 1860^T и видов *Pyrobaculum* была меньше 75%, что значительно ниже порогового значения 95-96% (Goris et al., 2007; Richter and Rosselló-Móra, 2009).

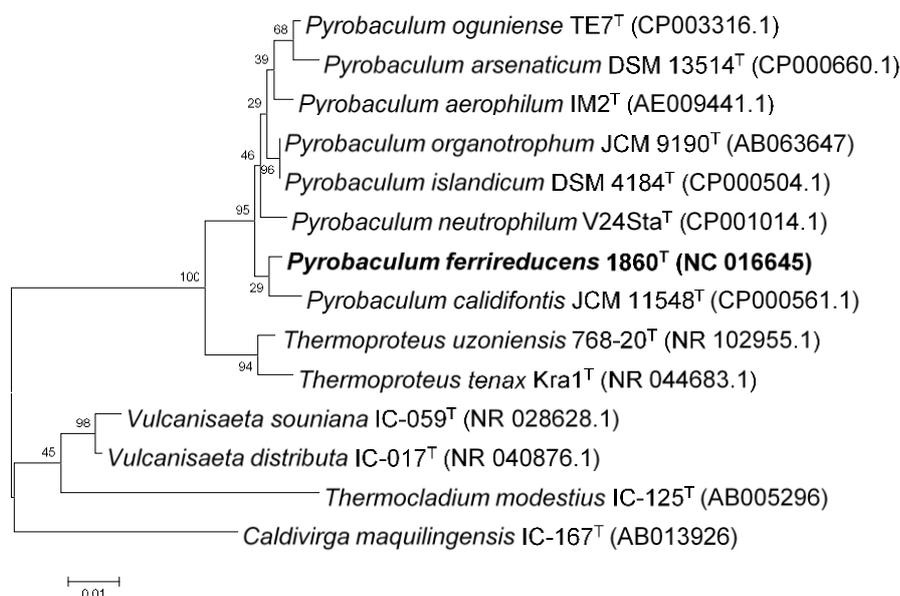


Рисунок 22. Дендрограмма, основанная на последовательности гена 16S рРНК, показывающая филогенетическое положение *Pyrobaculum ferrireducens* 1860^T, масштабная линейка – 1.0% различия последовательностей.

Штамм 1860^T – строго анаэробная, гетеротрофная, гипертермофильная архея, родственная видам рода *Pyrobaculum*, с которыми имеет общие фенотипические черты такие как морфология, диапазон температур, pH и солености роста, основные источники углерода и энергии. Для многих видов *Pyrobaculum* показана способность к железоредукции (Feinberg et al., 2008). Штамм 1860^T первый представитель этого рода, выделение которого от первичной накопительной до чистой культуры проходило с использованием Fe(III) в качестве акцептора электронов. Способность восстанавливать соединения селена и мышьяка, которой обладает 1860^T, среди гипертермофилов показана только для представителей рода *Pyrobaculum* (Huber et al., 2000). Основные характеристики штамма 1860^T в сравнении с другими членами *Pyrobaculum* представлены в Таблице 20.

На основании филогенетического анализа и фенотипических и физиологических свойств, мы предлагаем считать штамм 1860^T типовым штаммом нового вида рода *Pyrobaculum* – *Pyrobaculum ferrireducens* sp. nov.

Типовой и единственный штамм 1860^T депонирован в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под номером DSM 28942^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером VKM В- 2856^T.

Таблица 20. Сравнительные характеристики видов рода *Pyrobaculum*. Сокращения: нд = нет данных.

Характеристика	<i>P.ferrireducens</i>	<i>P.islandicum</i>	<i>P.organotrophum</i>	<i>P.arsenaticum</i>	<i>P.neutrophilum</i>	<i>P.aerophilum</i>	<i>P.oguniense</i>	<i>P.calidifontis</i>
Место выделения	Горячий источник, Камчатка, Россия	Сольфатара, Исландия	Сольфатара, Исландия	Сольфатара Пискарелли, Италия	Горячий источник, Керлинггарфьолл Исландия	Мелководная гидротерма, о. Иския, Италия	Горячий источник Оруни-хо, Япония	Горячий источник, Каламба, Филиппины
Температура, °С (мин-(опт)-макс)	75-(90-95)-98	74-(100)-102	78-(102)-102	68-(нд)-100	нд (85)	75-(100)-104	70-(90-94)-97	75-(90-95)-100
pH (мин-(опт)-макс)	5.5-(6.0-7.0)-7.5	5.0-(6.0)-7.0	5.0-(6.0)-7.0	нд	нд (6.5)	5.8-(7.0)-9.0	5.4-(6.3-7.0)-7.4	5.5-(7.0)-8.0
Отношение к кислороду	Строгий анаэроб	Строгий анаэроб	Строгий анаэроб	Строгий анаэроб	Строгий анаэроб	Факультативн микроаэроб	Факультативный аэроб	Факультативный аэроб
Автотрофия	-	+	-	+	+	+	-	-
Акцептор электронов для выделения	Fe(III)	Элементная сера	Элементная сера	Арсенат	Элементная сера	Нитрат	Кислород	Кислород
Используемые акцепторы электронов								
Fe(III)	+	+*	нд	+*	нд	+*	нд	+*
Нитрат	+	нд	нд	-	нд	+	-	+
Элементная сера	-	+	+	+	+	-	+	-
тиосульфат	+	+	-	+	нд	+**	+	-
Сульфит	-	+	-	нд	нд	нд	нд	-
Селенит	+	нд	нд	-	нд	+**	нд	нд
Селенат	+	-**	-**	+	нд	+**	нд	нд
Арсенат	+	+**	-**	+	нд	+**	нд	нд
Ссылки	Данная работа	Huber et al., 1987; *Feinberg et al., 2008; **Huber et al., 2000	Huber et al., 1987; *Huber et al., 2000	Huber et al., 2000; *Feinberg et al., 2008;	Fischer et al. 1983	Völkl et al., 1993; *Feinberg et al., 2008; **Huber et al., 2000	Sako et al., 2001	Amo et al., 2002; *Feinberg et al., 2008

Carboxydocella manganica SLM61^T sp. nov.

Штамм SLM 61^T был выделен из пробы 1861 воды и осадка, отобранной в сентябре 2008 года из горячего источника «Тростниковый», Узон, Камчатка. Образцы отбирали анаэробно в плотно закрывающиеся флаконы, транспортировали в лабораторию и хранили при +4°C до начала работы.

Колонии и морфология клеток. В агаризованной среде линзообразные, белые или бежевые колонии 0.5-1.0 мм в диаметре, появлялись через 3 суток. Клетки штамма SLM61^T представляли собой прямые палочки, 0.5-0.6 мкм толщиной и 1.0-6.0 мкм длиной (Рисунок 23). Клетки встречались поодиночке или в парах и беспорядочно двигались за счёт перитрихальных жгутиков. Образование спор не наблюдалось.

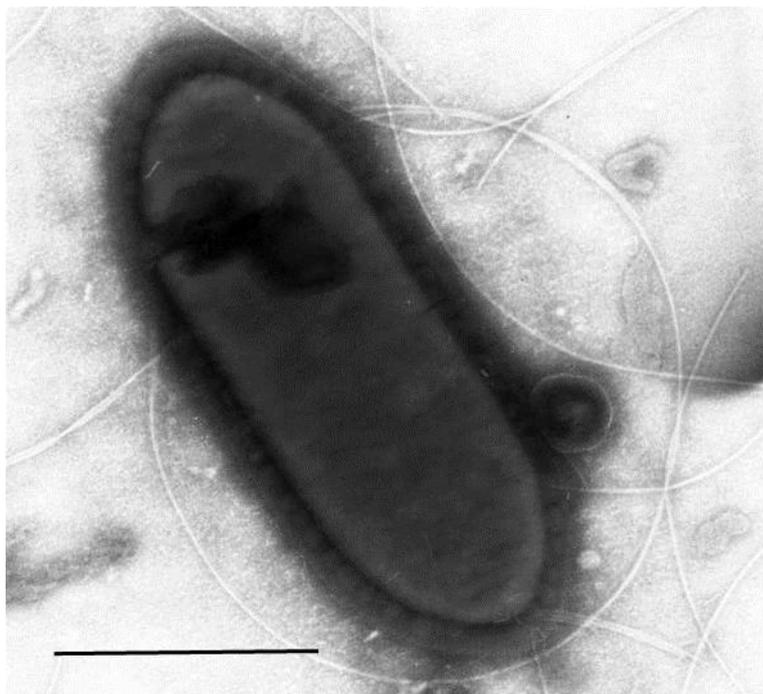


Рисунок 23. Электронная микрография негативно окрашенных клеток штамма SLM61^T, показывающая морфологию клетки и положение жгутиков, масштабная линейка, 0.5 мкм.

Физиологические характеристики. Температурный диапазон для роста штамма SLM61^T составлял – 26-70°C, с оптимумом при 58-60°C. Роста не наблюдалось при 71°C и выше или при температурах в 25°C и ниже после трёх недель инкубации. Штамм SLM61^T рос в диапазоне рН от 5.5 до 8.0, с оптимумом при рН 6.5. При рН 5.0 и ниже или при рН 8.5 и выше роста отмечено не было. Рост штамма SLM61^T наблюдался при концентрации NaCl в среде от 0 до 2.0% (вес/об.), с оптимумом при 0.5 % (вес/об.); рост отсутствовал при 3.0% NaCl и выше.

Дрожжевой экстракт не был необходим для роста, но добавление 0,2 г/л дрожжевого экстракта увеличивало конечную концентрацию клеток в 10-15 раз. Способность восстанавливать потенциальные акцепторы электронов проверяли с лактатом в качестве донора электронов в присутствии 0.2 г/л дрожжевого экстракта. Штамм использовал оксид марганца (25 ммоль Mn(IV)/л), ферригидрит (90 ммоль Fe(III) /л), цитрат Fe(III) (10 mM), и нитрат калия (10 mM). Сульфат (14 mM), элементная сера (10 г/л), тиосульфат, АХДС, фумарат (20 mM каждого) или кислород (3 или 20 % (об.) в газовой фазе) не восстанавливались и не поддерживали рост. В процессе восстановления черный нерастворимый MnO₂ превращался в светло-коричневый осадок меньшего объема, содержащий 5-7 mM Mn(II). Ферригидрит восстанавливался в черный магнитный осадок, содержащий 25-30 mM Fe(II). В неинокулированных контролях с 0.2 г/л дрожжевого экстракта и лактатом (14 mM) в среде, содержащей оксид Fe(III), Mn(IV), изменения цвета среды, цвета и количества осадка не происходило в течение всего времени инкубации при 60°C. Нитрат восстанавливался в аммоний. Лактат окислялся не полностью, до ацетата. Штамм SLM61^T рос и восстанавливал Fe(III), Mn(IV) или нитрат с лактатом, пируватом (14 mM каждого), формиатом, бутиратом, сукцинатом (20 mM каждого), дрожжевым экстрактом, пептоном, триптоном (2.5 г/л каждого) или H₂/CO₂ (80/20 (об.)) в качестве донора электронов. Изолят мог расти хемолитоавтотрофно в отсутствие дрожжевого экстракта с водородом и ферригидритом (но не с Mn(IV) или нитратом) в качестве донора и акцептора электронов и CO₂ в качестве источника углерода. Он также рос без добавления акцептора в

среду за счет брожения с пируватом, глюкозой, фруктозой, сахарозой, мальтозой (15 мМ каждого) или дрожжевым экстрактом (2.5 г/л). Основными продуктами брожения с глюкозой был ацетат, этанол, формиат, лактат и сукцинат образовывались в следовых количествах, образования водорода не наблюдалось. Время удвоения в оптимальных условиях на пирувате составляло 40 мин. Штамм не использовал ацетат (10 мМ), пропионат, фумарат, малеинат, метанол, этанол или глицерин (20 мМ каждого) с Fe(III), Mn(IV), или нитратом в качестве акцептора электронов. С пептоном или триптоном (2.5 г/л) штамм SLM61^T рос только при добавлении акцептора электронов. Ксилоза, L-арабиноза, лактоза, галактоза, целлобиоза (15 мМ каждого), крахмал (2.5 г/л) или цитрат (10 мМ) не использовались независимо от наличия или отсутствия акцептора. Штамм также не рос и не восстанавливал ферригидрит, оксид марганца или нитрат, и не рос без добавления акцептора электронов при культивировании с монооксидом углерода (5, 15, 45, или 100% (об.) CO в газовой фазе). Пенициллин, ампициллин, стрептомицин, новобиоцин, канамицин и неомицин (100 мкг/мл каждого) полностью ингибировали рост SLM61^T.

Хемотаксономический анализ. В состав жирных кислот входили прямоцепочечные и разветвленные насыщенные и мононенасыщенные кислоты. Доминировала C_{16:0} (31.8%); также были детектированы iso-C_{15:0}, C_{16:1}ω7c, iso-C_{17:0}, iso-C_{17:1}ω8, C_{18:0}, C_{18:1}ω7 (5.23–9.95%) и минорные количества C_{14:0}, C_{15:0}, iso-C_{16:0}, C_{16:1}ω9, iso-C_{17:1}ω6c, anteiso-C_{17:0}, C_{17:0} и C_{18:0}ω9 (1.10–2.75%). Содержание Г+Ц в геномной ДНК штамма SLM61^T – 50.9 мол% (T_m).

Филогенетический анализ. Сравнение 1522 п.н. гена 16S рРНК с базой данных GenBank выявило принадлежность штамма SLM61^T роду *Carboxydocella* (Рисунок 24). В момент описания нового изолята род *Carboxydocella* включал в себя два вида с валидно-описанными именами. SLM61^T обладал наибольшим сходством с геном 16S рРНК *C. thermautotrophica* 41^T (96.9 %). Уровень сходства с другим видом этого рода, *C. sporoproducens* Kar^T, составил 96.7%.

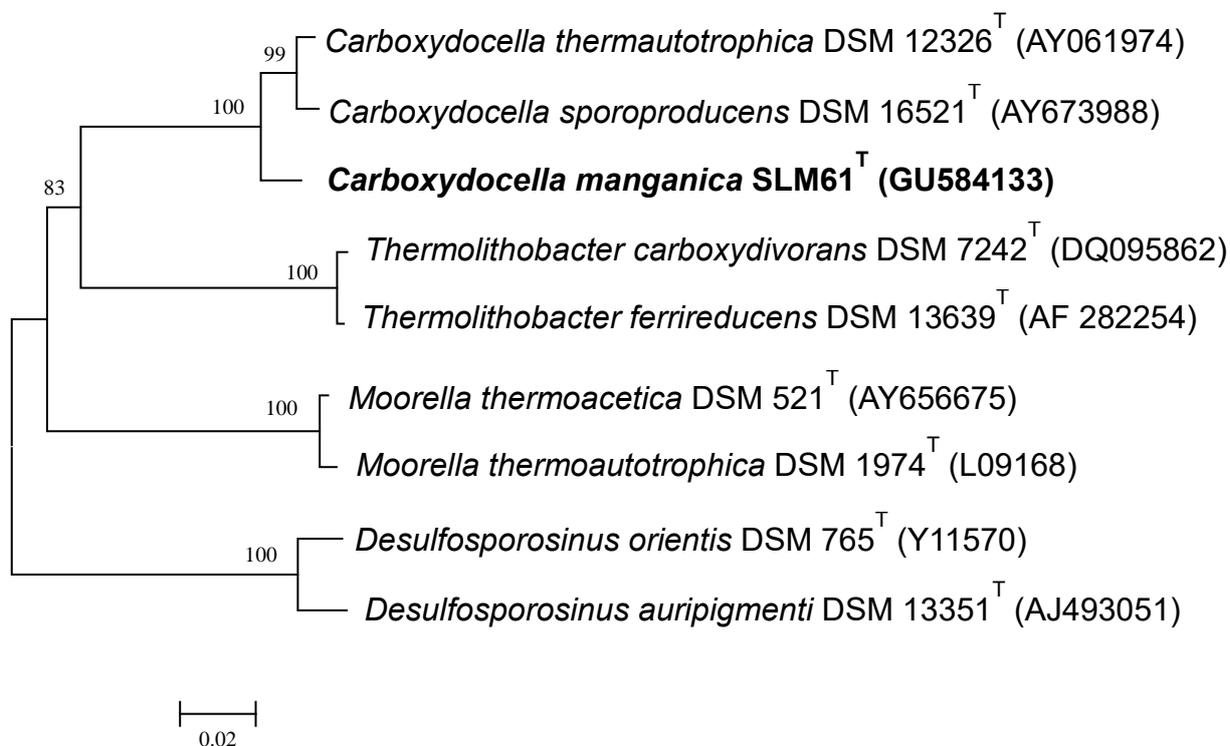


Рисунок 24. Дендрограмма, основанная на последовательности гена 16S рPHK, показывающая филогенетическое положение *Carboxydocella manganica* SLM61^T, масштабная линейка – 2% различия последовательностей

Все представители *Carboxydocella* были выделены из горячих источников Камчатки, и имеют близкую морфологию и физико-химические параметры роста. Новый изолят обладает рядом значительных отличий (Таблица 21). Прежде всего, это неспособность к карбоксидотрофному росту. В отличие от близкородственных видов, SLM61^T может восстанавливать нитрат и использует более широкий спектр субстратов, включая моно- и дисахариды, органические кислоты, а также водород. Способность представителей *Carboxydocella* восстанавливать железо и/или марганец ранее не была описана. Проведенные нами эксперименты показали, что типовой вид рода, *C. thermautotrophica*, не обладает такой способностью, тогда как *C. sporoproducens* может расти и восстанавливать Fe(III) и Mn(IV) с

лактатом в качестве донора электронов. Следовательно, эта способность не уникальна для нового изолята, а характерна для рода *Carboxydocella*.

На основании результатов филогенетического анализа и исследования физиологических и генотипических свойств, которые явно отличают штамм SLM61^T от других видов рода *Carboxydocella* (Таблица 21), мы предложили описать штамм SLM61^T как типовой штамм нового вида, *Carboxydocella manganica*.

Типовой и единственный штамм SLM61^T депонирован в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) под номером DSM 23132^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером VKM В- 2609^T.

Таблица 21. Дифференцирующие характеристики видов рода *Carboxydocella*

Характеристика	<i>C. manganica</i>	<i>C. sporoproducens</i>	<i>C. thermautotrophica</i>
Использование СО	–	+	+
Акцептор электронов:			
Mn(IV)	+	+	–
Fe(III)	+	+	–
KNO ₃	+	–	–
Electron donor:			
Дрожжевой экстракт	+	+	–
Пептон, триптон	+	–	–
Водород	+	–	–
Формиат	+	–	–
Лактат	+	+	–
Пируват	+	+	–
Глюкоза, фруктоза, мальтоза	+	–	–
Сахароза	+	+	–
Основные жирные кислоты клетки (% общего содержания)	C _{16:0} (31.38), C _{16:1ω7c} (9.95), iso-C _{17:0} (9.90)	C _{16:0} (35.84), C _{18:0} (16.35)	C _{16:0} , (38.58), C _{18:0} (15.47)
Г+Ц состав (мол.%)	50.9	49.5	46.0

Geoglobus acetivorans SBH6^T sp. nov.

Штамм SBH6^T был выделен из фрагмента гидротермальной постройки («черного курильщика»), отобранной на глубоководном гидротермальном поле Ашадзе (12° 58' 21'' N 44° 51' 47'' W) Срединно-Атлантического Хребта в марте 2007 года. Отбор проб с глубины 4100 м производился с помощью автоматического спускаемого аппарата Victor. На борту исследовательского судна в стерильных анаэробных условиях образцы измельчали, помещали в стерильные пробирки Falcon объемом 50 мл вместе с морской водой. Полностью заполненные пробирки закрывали завинчивающейся крышкой и хранили при +4°C до начала работы.

Морфология клеток. Клетки штамма представляли собой правильные или неправильные мелкие кокки, приблизительно 0.3-0.5 мкм в диаметре. Клетки, обычно одиночные, имели один или несколько жгутиков (Рисунок 25).

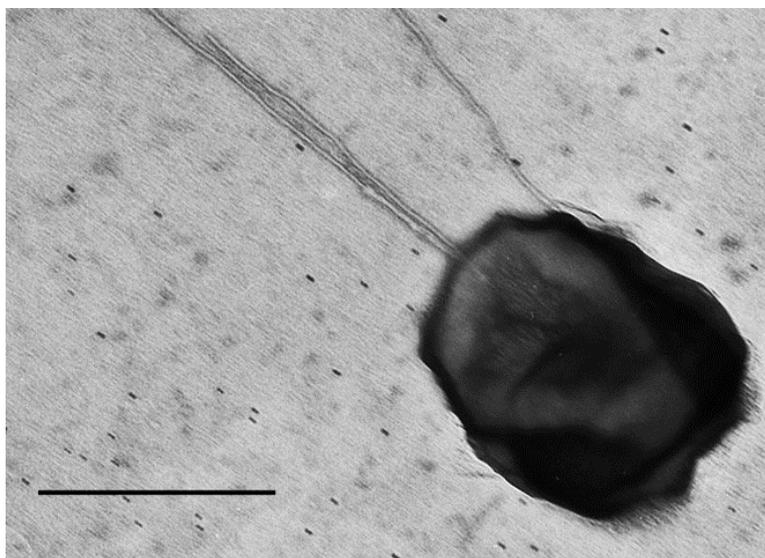


Рисунок 25. Электронная микрография негативно окрашенных клеток штамма SBH6^T, показывающая морфологию клетки и положение жгутиков, масштабная линейка, 0.5 мкм.

Физиологические характеристики. Температурный диапазон роста штамма SBH6^T составлял 50-85°C с оптимумом при 81°C. Роста не наблюдалось при 90°C и выше и при 46°C и ниже в течение 3х недель инкубации. Диапазон pH составлял 5.0-7.5 с оптимумом при pH 6.8. Роста не было при pH 4.5 и ниже и 8.0 и выше. Штамм рос при концентрации NaCl от 1.0 до 6.0% (вес/об.) с оптимумом при 2.5%, и не рос в отсутствие или при 7% NaCl (вес/об.).

Рост изолята сопровождался восстановлением ферригидрита (90 ммоль Fe(III)/л) и образованием черного осадка с магнитными свойствами и содержанием Fe(II) 25-30ммоль/л. В неинокулированных контролях при инкубировании при 82°C изменения цвета и объема осадка не наблюдалось. Штамм SBH6^T использовал ацетат (4.5 или 18 mM), формиат, пируват, fumarат, малат, пропионат, бутират, сукцинат (20 mM каждого), стеарат, пальмитат (0.5-1.0 mM каждого), пептон или дрожжевой экстракт (10 г/л каждого) в качестве донора электронов для железоредукции. В процессе роста с ацетатом (4.5 mM) и Fe(III) в отсутствие дрожжевого экстракта, 80% ацетата потреблялось и отношение образованного Fe(II) к потребленному ацетату составило 7.5. Штамм также мог расти с молекулярным водородом в качестве единственного донора электронов для восстановления Fe(III) и CO₂ в качестве источника углерода. Рост был литоавтотрофным и не требовал органических источников углерода. В отсутствие водорода, не было ни роста клеток, ни восстановления железа.

Штамм SBH6^T не использовал лактат, метанол, этанол, L-аланин, глицин (20 mM каждого), L-пролин, аргинин, серин, глутами, аспарагин, L-цистеин, глутаминовую и аспарагиновую кислоты (10 mM каждого), бензоат (0.5, 1.0 2.0 или 20 mM) с ферригидритом как акцептором электронов.

Кроме ферригидрита, изолят мог расти, используя растворимую форму Fe(III) – цитрат железа, однако, конечная концентрация клеток была значительно ниже. Fe(III) цитрат восстанавливался не полностью; не более 5-6 mM Fe(II) образовывалось при росте с 10 mM цитрата железа. Штамм не рос с сульфатом (14 mM), тиосульфатом (20 mM), элементарной

серой (10 г/л), нитратом (10 мМ), фумаратом (20 мМ), MnO_2 (25 ммоль $Mn(IV)$ /л), АХДС (20 мМ) и кислородом (2 или 20% об.) в качестве акцептора электронов с ацетатом (18 мМ), водородом ($H_2:CO_2$ 80:20% об.), лактатом, бутиратом или глицерином (20 мМ каждого) в качестве доноров электронов.

Филогенетический анализ. Сравнение 1417 нуклеотидов гена 16S рРНК штамма SBH6^T с аналогичными последовательностями, содержащимися в базе данных GenBank выявило наиболее высокий уровень сходства с *Geoglobus ahangari* 234^T (97 %). Уровень сходства генов 16S рРНК с другими членами порядка *Archaeoglobales* был 94.9–95.3 % (Рисунок 26).

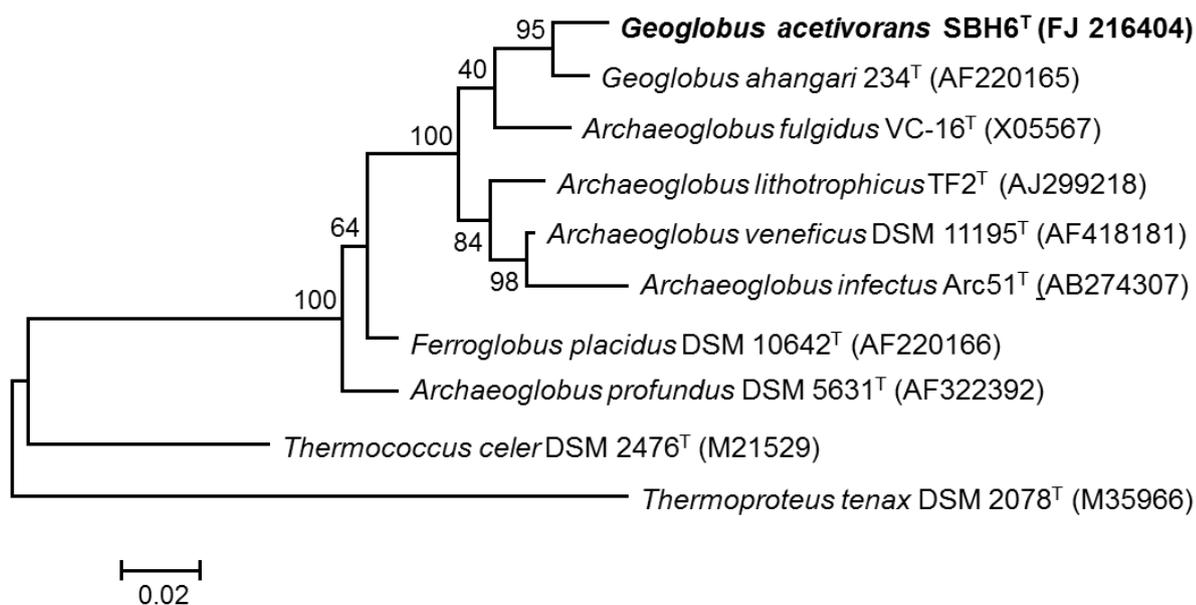


Рисунок 26. Дендрограмма, основанная на последовательности гена 16S рРНК, показывающая филогенетическое положение *Geoglobus acetivorans* SBH6^T. Масштабная линейка - 2% различия последовательностей.

Род *Geoglobus* представлен единственным видом, *G. ahangari* (Kashefi et al., 2002b), полученным из глубоководной морской гидротермы Бассейна Гуаймас, Калифорнийский

залив. Штамм SBH6^T имеет общие физиологические черты с описанным представителем рода. Прежде всего, это облигатная зависимость от Fe(III), причем предпочтительна его нерастворимая форма. Кроме того, оба организма имеют практически одинаковый спектр используемых доноров электронов. Оба представителя *Geoglobus* являются одними из немногих гипертермофилов, способных использовать ацетат, причем штамм SBH6^T является первым гипертермофилом, который был выделен с использованием ацетата в первичных накопительных культурах. К фенотипическим различиям можно отнести более низкую температуру роста нового изолята, оптимум роста которого 81°C, что на 7°C ниже, чем у *G. ahangari*. Филогенетические различия, определенные сначала как разница в последовательностях генов 16S рРНК, были подтверждены затем при сравнении полноразмерных геномов. Результаты средней нуклеотидной идентичности (ANI) составили 73.5%, что значительно ниже порога, определяющего принадлежность к разным видам. (Goris et al., 2007; Richter and Rosselló-Móra, 2009).

На основании результатов филогенетического анализа и исследования физиологических свойств, мы предложили отнести штамм SBH6^T к новому виду рода *Geoglobus* и описать как типовой штамм нового вида *Geoglobus acetivorans*.

Типовой и единственный штамм SBH6^T депонирован в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) под номером DSM 21716^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером VKM B-2522^T).

***Deferribacter autotrophicus* SL 50^T sp. nov.**

Штамм SL50^T был выделен из фрагмента гидротермальной постройки («черного курильщика»), отобранной на глубоководном гидротермальном поле Ашадзе (12° 58' 21'' N 44° 51' 47'' W) Срединно-Атлантического Хребта в марте 2007 года. Отбор проб с глубины 4100 м производился с помощью автоматического спускаемого аппарата Victor. На борту

исследовательского судна в стерильных анаэробных условиях образцы измельчали, помещали в стерильные пробирки Falcon объемом 50 мл вместе с морской водой. Полностью заполненные пробирки закрывали завинчивающейся крышкой и хранили при +4°C до начала работы.

Колонии и морфология клеток. В столбиках агара коричневые линзообразные колонии 0.2-0.5 мм в диаметре появлялись через 7-10 суток инкубации при 50°C. Клетки нового изолята представляли собой тонкие прямые или изогнутые палочки 0.5-0.6 мкм в диаметре и длиной 3.0-3.5 мкм (Рисунок 27). Клетки встречались в виде отдельных клеток, пар или коротких цепочек и были подвижными за счет одного полярного жгутика. Формирования спор не наблюдалось. Ультратонкие срезы штамма SL50^T выявили грамотрицательный тип клеточной стенки.

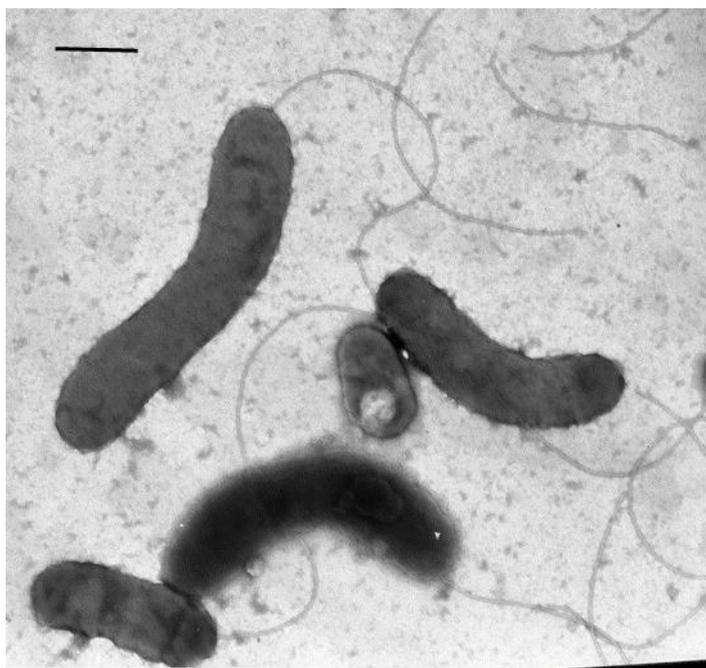


Рисунок 27. Электронная микрография негативно окрашенных клеток штамма SL50^T, показывающая морфологию клетки и положение жгутиков, масштабная линейка, 0.5 мкм.

Физиологические характеристики. Температурный диапазон роста штамма SL50^T составлял 25-75°C с оптимумом при 60°C. Роста не наблюдалось при 80°C и выше и при 22°C

и ниже в течение 3х недель инкубации. Диапазон pH составлял 5.0-7.5 с оптимумом при pH 6.5. Роста не было при pH 4.5 и ниже и 8.0 и выше. Штамм рос при концентрации NaCl от 1.0 до 6.0% (вес/об.) с оптимумом при 2.5%, и не рос в отсутствие или при 7.0% NaCl (вес/об.).

Добавление дрожжевого экстракта не было необходимым для роста, но значительно стимулировало его. Штамм SL50^T рос с пептоном, дрожжевым экстрактом (10 г/л каждого), формиатом, ацетатом, лактатом, пируватом, фумаратом, малатом, малеинатом, сукцинатом, пропионатом и мальтозой (25 мМ каждого) в качестве донора электронов и нитратом (10 мМ) в качестве акцептора в присутствии 0.2 г/л дрожжевого экстракта. Мальтоза полностью окислялась в CO₂ без образования растворимых продуктов брожения. Потребление водорода зависело от акцептора электронов. С ферригидритом водород потреблялся хемолитоавтотрофно, для роста с Mn(IV) требовалось наличие дрожжевого экстракта (0.2 г/л). При использовании нитрата или элементной серы роста с водородом не наблюдалось, независимо от наличия или отсутствия дрожжевого экстракта. Штамм SL50^T не использовал казеин, триптон, крахмал (10 г/л каждого), метанол, этанол, пропанол, изо-пропанол, бутанол (20 мМ каждого), фруктозу, ксилозу, целлобиозу, сахарозу, арабинозу (25 мМ каждого), глицерин, бутират или бензоат (20 мМ каждого) с нитратом в качестве акцептора.

С ацетатом (18 мМ) или лактатом (1.5 г/л) в присутствии дрожжевого экстракта (0.2 г/л) SL50^T использовал нитрат (10 мМ), элементную серу (10 г/л), цитрат Fe(III) (5 мМ), ферригидрит (90 ммоль Fe(III)/л), (25 мМ) и АХДС (20 мМ) в качестве акцепторов электронов. Сульфат (14 мМ), тиосульфат и фумарат (20 мМ каждого) не восстанавливались и не поддерживали рост. Ферригидрит восстанавливался в черный магнитный осадок с содержанием Fe(II) 25-30 мМ. Черный нерастворимый MnO₂ в процессе роста культуры превращался в светло-коричневый осадок, практически полностью растворявшийся при длительной инкубации. В неинокулированных контролях с 0.2 г/л дрожжевого экстракта в среде, содержащей оксид Fe(III), Mn(IV) или АХДС, изменения цвета среды, цвета и количества осадка не происходило в течение всего времени инкубации при 60°C. Сера

восстанавливалась в сульфид. Продуктом восстановления нитрата был аммоний; NO, N₂O или нитрит в детектируемых количествах не образовывались.

Характеристики ДНК и филогенетический анализ. Содержание Г+Ц в геномной ДНК штамма SL50^T – 28.7 мол% (T_m).

Сравнение 1543 нуклеотидов гена 16S рРНК штамма SL50^T с аналогичными последовательностями, содержащимися в базе данных GenBank показало, что штамм принадлежит к роду *Deferribacter* (Рисунок 28) и имеет наибольшее сходство с геном 16S рРНК *D. abyssi* JR^T (97.8%). Сходство с генами других членов рода составляло около 95%.

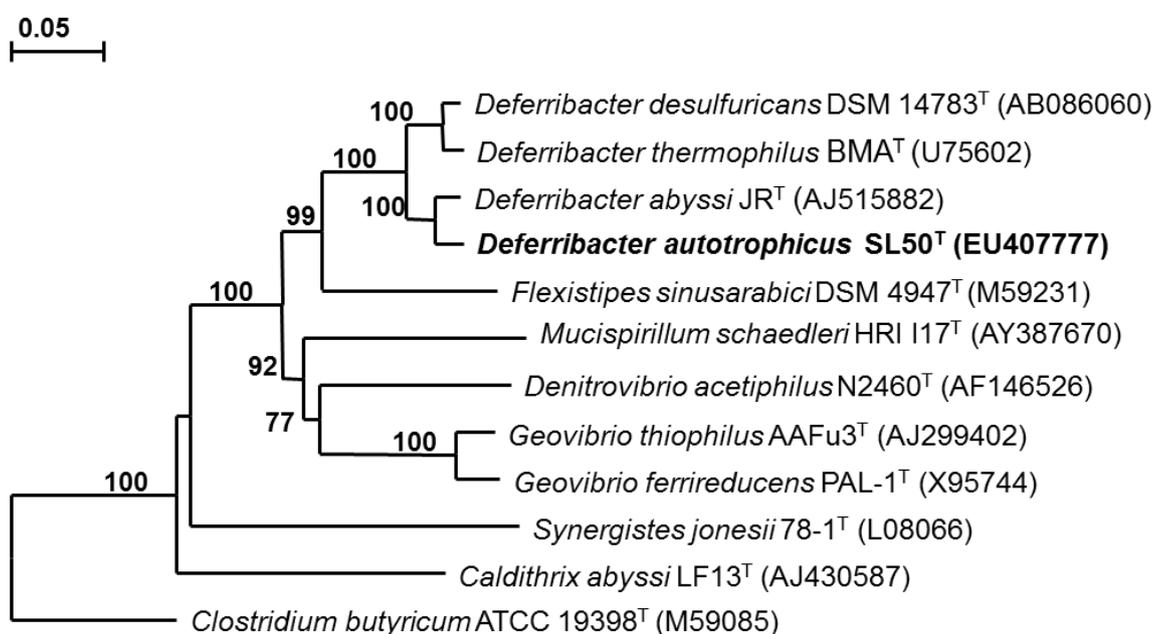


Рисунок 28. Дендрограмма, основанная на последовательности гена 16S рРНК, показывающая филогенетическое положение *Deferribacter autotrophicus* SL50^T, масштабная линейка – 5% различия последовательностей.

Полученный новый изолят способен восстанавливать железо и марганец, а также серу и нитрат, которые являются широко распространенными веществами в морских глубоководных гидротермах, откуда и были выделены почти все представители рода *Deferribacter*. Штамм SL50^T имеет сходную с близкородственными организмами морфологию и основные метаболические свойства, включая анаэробное окисление

органических соединений с различными акцепторами электронов, но не за счет брожения. В то же время штамм SL50^T обладает рядом характеристик, существенно отличающих его от других видов рода *Deferribacter* (Таблица 22). К ним, в частности, относится восстановление нитрата в аммоний, а не в нитрит, и способность к утилизации дисахарида (мальтозы). Новым свойством является литоавтотрофный рост с Fe(III) в качестве акцептора электрона. Ранее способность к автотрофному росту была показана только для одного вида рода *Deferribacter*, *D. abyssi*, который в качестве акцепторов электронов использовал нитрат или элементарную серу, но не железо (III). Штамм SL50^T - первая морская глубоководная бактерия, способная к автотрофному росту за счет восстановления Fe(III).

На основании филогенетического анализа и фенотипических и физиологических свойств, мы предлагаем считать штамм SL50^T типовым штаммом нового вида рода *Deferribacter* - *Deferribacter autotrophicus* sp. nov.

Типовой и единственный штамм SL50^T депонирован в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) под номером DSM 21529^T и во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под номером VKPM B-10097^T.

Таблица 22. Дифференцирующие характеристики видов рода *Deferribacter*.

Характеристика	Штамм SL50 ^T	<i>D. abyssi</i>	<i>D. thermophilus</i>	<i>D. desulfuricans</i>
Температура роста (мин- (опт)-макс), °С	25-(60)-75	45-(60)-65	50-(60)-65	40-(60-65)-70
Акцепторы электронов:				
Элементная сера	+	+	-	+
Fe(III)	+	+	+	-
Mn(IV)	+	-	+	-
Доноры электронов:				
Этанол	-	-	-	+
Формиат	+	-	-	+
Пропионат	+	-	-	+
Малат	+	-	-	+
Мальтоза	+	-	-	-
Хемолитоавтортrophic рост с различными акцепторами электронов:				
Fe(III)	+	-	-	-
Элементная сера	-	+	-	-
Нитрат калия	-	+	-	-
Содержание Г+Ц (мол. %)	28.7	30.8	34.0	38.6

***Deferrisoma camini* S3R1^T gen. nov., sp. nov.**

Штамм S3R1^T был выделен из фрагмента гидротермальной постройки («черного курильщика»), отобранной на глубоководном гидротермальном поле ABE (20° 45.8' S 176°11.5' W) спредингового центра Лау в юго-восточной части Тихого океана в июне 2009 года. Отбор проб с глубины 2104–2163 м производился с помощью автоматического спускаемого аппарата JASON II. На борту исследовательского судна в стерильных анаэробных условиях (под током N₂) образцы измельчали и помещали в стеклянные стерильные пробирки с морской водой. Полностью заполненные пробирки закрывали резиновой пробкой и алюминиевой крышкой и хранили при +4°C до начала работы.

Морфология клеток. Клетки нового изолята представляли собой короткие палочки или овалы 0.5-0.6 мкм в диаметре и длиной 0.8-1.3 мкм (Рисунок 29а). Клетки встречались в виде отдельных клеток или пар и были подвижными за счет одного полярного жгутика. Формирования спор не наблюдалось. Ультратонкие срезы штамма S3R1^T выявили грамотрицательный тип клеточной стенки (Рисунок 29b).

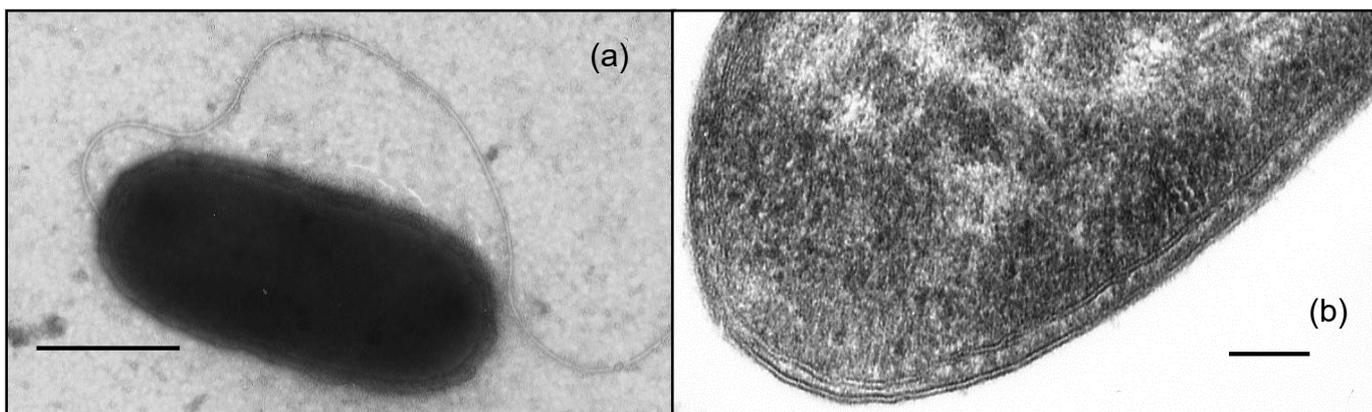


Рисунок 29. (а) Электронная микрография негативно окрашенных клеток штамма S3R1^T, показывающая морфологию клетки и положение жгутика, масштабная линейка, 0.5 мкм. (b) Ультратонкий срез, показывающий строение клеточной стенки, масштабная линейка, 0.1 мкм.

Физиологические характеристики. Температурный диапазон роста штамма S3R1^T составлял 36-62°C с оптимумом при 50°C. Роста не наблюдалось при 65°C и выше и при 30°C и ниже в течение 3х недель инкубации. Диапазон pH составлял 5.5-7.5 с оптимумом при pH 6.5. Роста не было при pH 5.0 и ниже и 8.0 и выше. Штамм рос при концентрации NaCl от 1.0 до 5.0% (вес/об.) с оптимумом при 2.0-2.5% (вес/об.) и не рос при 0.7%(вес/об.) и ниже или при 5.5% (вес/об.) и выше.

Штамм S3R1^T восстанавливал ферригидрит в черный осадок, содержащий 25-30 мМ Fe(II). В неинокулированных контролях изменений цвета и количества осадка не наблюдалось в течение всего периода инкубации при 50°C. Кроме нерастворимой формы

трехвалентного железа, штамм восстанавливал растворимые цитрат Fe(III) и нитроацетат Fe(III), но не восстанавливал этилендиаминтетраацетат железа (Fe(III)-ЭДТА) или пиродифосфат Fe(III) (10 мМ каждого). Рост с цитратом железа был значительно лучше (конечная концентрация клеток $8-12 \times 10^7$ кл./мл, время удвоения 2.6 ч), чем при использовании других форм железа (количество клеток $1-2 \times 10^7$ кл./мл, время удвоения 7.3 ч). Потенциальные доноры электронов тестировали в среде с цитратом железа или ферригидритом в отсутствие дрожжевого экстракта. Изолят использовал ацетат, фумарат, малат, малеинат, сукцинат, пропанол (10 мМ каждого), пальмитат, стеарат (1 мМ каждого), пептон или дрожжевой экстракт (0.2 или 1.0 г/л каждого) для роста и восстановления Fe(III). Все доноры электронов полностью окислялись до CO₂ и H₂O, образования органических кислот или спиртов не детектировалось. Штамм S3R1^T не использовал лактат, пируват, тартрат, оксалат, формиат, пропионат, бутират, глицерин, метанол, этанол, изо-пропанол, бутанол (10 мМ каждого), триптон (0.2 или 1.0 г/л) или H₂/CO₂ (80:20 (об.)) с цитратом железа или ферригидритом в качестве акцепторов электронов. Штамм не сбраживал глюкозу, фруктозу, мальтозу, сахарозу, целлобиозу, арабинозу (15 мМ каждого), цитрат или малат (10 мМ). В дополнение к Fe(III) штамм S3R1^T использовал элементную серу (10 г/л) в качестве акцептора электронов, восстанавливая ее в сульфид, с фумаратом (10 мМ) или дрожжевым экстрактом (0.2 г/л) в качестве доноров электронов. Однако, концентрация клеток при росте с серой не превышала $5-8 \times 10^6$ кл./мл, а образование сульфида не превышало 1 мМ. Водород не поддерживал роста с серой. Штамм S3R1^T не восстанавливал оксид марганца (25 ммоль Mn(IV)/л), сульфит (5 мМ), сульфат, тиосульфат, нитрат, фумарат, АХДС или кислород (2.0 или 20% в газовой фазе) с с фумаратом (10 мМ) или дрожжевым экстрактом (0.2 г/л) или H₂/CO₂ (80:20 (об.)) в качестве доноров электронов.

Пенициллин, ампициллин, новобиоцин и хлорамфеникол (100 мкг/мл каждого) полностью ингибировали рост S3R1^T, тогда как канамицин и неомицин (100 мкг/мл каждого) рост не ингибировали.

Хемотаксономический анализ. Основными жирными кислотами штамма S3R1^T были iso-C_{17:0}, iso-C_{15:0} и iso-C_{17:1}ω8 (34.0, 19.2 и 17.2%, соответственно); также были детектированы, γC_{18:3} (9.7 %) и C_{18:0} (8.2%). Другие жирные кислоты присутствовали в минорных или следовых количествах (менее 5%). Содержание Г+Ц в геномной ДНК штамма S3R1^T – 64.4 мол% (T_m).

Филогенетический анализ. Сравнение 1522 п.н. гена 16S рРНК с базой данных GenBank выявило, что изолят входит в класс *Deltaproteobacteria* (Рисунок 30). Штамм S3R1^T филогенетически равноудален от представителей порядков *Desulfuromonadales* (84.2–86.4% сходства) и *Syntrophobacterales* (85.2–86.4 %). Наиболее близкородственными организмами являются *Desulfuromonas palmitatis* (86.43% сходства) и *Desulfoglaeba alkanexedens* (86.39 % сходства).

Порядок *Desulfuromonadales* включает в себя умеренно-термофильных железо- и сероредукторов, в то время как термофильные представители порядка *Syntrophobacterales* – это сульфатредукторы, для которых не показана способность к восстановлению серы или железа (Таблица 23). Выделенный штамм фенотипически ближе к членам *Desulfuromonadales* - *Geothermobacter ehrlichii*, *Geoalkalibacter subterraneus* и *Desulfuromonas palmitatis*, которые являются железоредукторами, неспособными к брожению и восстановлению сульфата, сульфита и тиосульфата, и растут при температурах около 40°C. Штамм S3R1^T отличается от известных представителей обоих порядков температурой роста, и используемыми акцепторами электронов. Штамм S3R1^T и родственные ему флотипы (89-93% сходства гена 16S рРНК) образуют явный четко выраженный кластер, отдаленно родственной *Syntrophobacterales* (Рисунок 30).

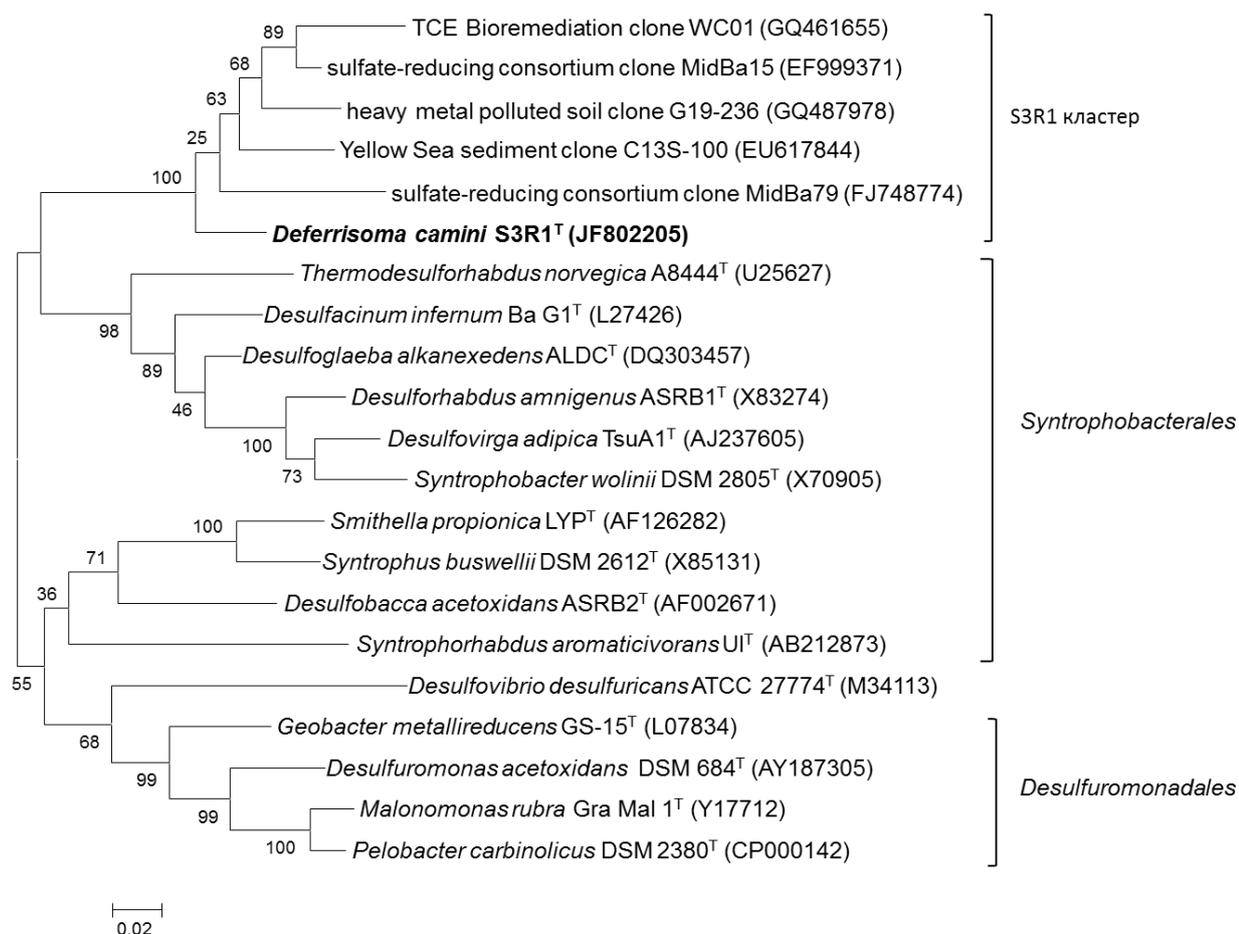


Рисунок 30. Дендрограмма, основанная на последовательности гена 16S рНК, показывающая филогенетическое положение *Deferrisoma camini* S3R1^T, масштабная линейка – 2% различия последовательностей

Новый изолят представляет собой умеренно-термофильную бактерию, рост которой обуславливается восстановлением трехвалентного железа или элементной серы. Она растет только огранотрофно, тогда как большинство глубоководных железоредукторов могут расти литоавтотрофно с молекулярным водородом. Штамм S3R1^T не может быть первичным продуцентом в глубоководных экосистемах, скорее он принимает участие в анаэробном разложении органического вещества в зоне отложений соединений Fe(III).

Низкая степень сходства гена 16S рНК полученного штамма со всеми другими, представленными в базах данных, определенно показывают, что S3R1^T представляет новый

вид нового рода, который может служить основой для нового семейства после обнаружения и характеристики других членов этой филогенетической линии. На основании результатов филогенетического анализа и исследования физиологических свойств, мы предложили отнести штамм S3R1^T к новому роду *Deferrisoma* с типовым видом *Deferrisoma camini*.

Типовой и единственный штамм S3R1^T депонирован в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) под номером DSM 24185^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером VKPM В-2672^T.

Таблица 23. Свойства *Deferrisoma camini* и термофильных или термотолерантных представителей порядков *Desulfuromonadales* и *Syntrophobacterales*. ВдЫ: 1, *Deferrisoma camini*; 2, *Desulfuromonas palmitatis*; 3, *Geoalkalibacter subterraneus*; 4, *Geothermobacter ehrlichii*; 5, *Desulfoglaeba alkanexedens*; 6, *Thermodesulforhabdus norvegicus*; 7, *Desulfacinum infernum*.

Характеристика	<i>Desulfuromonadales</i>				<i>Syntrophobacterales</i>		
	1	2	3	4	5	6	7
Источник выделения	Глубоководная гидротерма	Морской осадок	Нефтяное месторождение	Глубоководная гидротерма	Нефтешлам	Нефтяное месторождение	Нефтяной пласт
Температура, °С мин-(опт)-макс	36-(50)-60	ND- (40)	30-(40)-50	35-(55)-65	17-(31-37)-50	44-(60)-74	40-(60)-65
Г+Ц содержание ДНК (mol%)	64.4	54.7	52.5	62.6	53.6	51.0	64.0
Акцепторы электронов							
Сульфат	-	-	-	-	+	+	+
Сера	+	+	+	-	-	-	-
Тиосульфат	-	-	-	-	+	-	+
Сульфит	-	-	-	-	-	+	+
Нитрат	-	-	+	+	* нд	-	-
Fe(III)	+	+	+	+	-	нд	нд
Mn(IV)	-	+	+	-	нд	нд	нд

* нд, нет данных.

6.2. Общая характеристика новых термофильных прокариот, способных восстанавливать железо, и их геномов

Пять штаммов термофильных металлвосстанавливающих прокариот, выделенных из наземных горячих источников и морских глубоководных гидротерм, были описаны и узаконены как новые таксоны. Из наземных гидротерм были получены два штамма, представляющие новые архейный и бактериальный виды. В морских глубоководных экотопах к началу данной работы термофильные и гипертермофильные железоредукторы были представлены двумя видами *Bacteria*, *Geothermobacter ehrlichii* и *Deferribacter abyssi* (Kashefi et al., 2003; Miroshnichenko et al., 2003d) и тремя видами *Archaea*, *Thermococcus sp.* SN531, *Geoglobus ahangari* и '*Aciduliprofundum boonei*' (Slobodkin et al., 2001; Kashefi et al., 2002b; Reysenbach et al., 2006). Нами были выделены три новых штамма, представляющие один новый вид гипертермофильных архей и два новых вида бактерий. Все выделенные организмы принадлежат к разным филумам.

Все организмы способны к анаэробному дыханию с Fe(III), сопряженному с окислением органических веществ. Железоредакция играет важнейшую роль в их метаболизме. Рост *Geoglobus acetivorans* облигатно зависит от Fe(III). *Deferrisoma camini* может также использовать элементную серу, однако Fe(III) в форме цитрата является предпочтительным акцептором электронов. *Deferribacter autotrophicus* и *Carboxydocella manganica* могут использовать и альтернативные акцепторы электронов, однако, только ферригидрит поддерживает их литоавтотрофный рост, тогда как для роста с другими акцепторами электронов им необходимо наличие органических веществ. *Deferrisoma camini* и *Pyrobaculum ferrireducens* являются облигатными гетеротрофами. Среди выделенных организмов *P. ferrireducens* использует наибольшее число акцепторов электронов. *Carboxydocella manganica* отличается от других выделенных организмов тем, что кроме анаэробного дыхания обладает и бродильным типом метаболизма.

Для четырех из пяти новых железовосстанавливающих прокариот были определены полноразмерные геномные последовательности (Таблица 24). Как видно из результатов анализа, функции многих кодируемых белков пока не выяснены, особенно у представителей архей (более 30%). Способность к литоавтотрофному росту *Geoglobus acetivorans* и *Deferribacter autotrophicum* определяется наличием генов, кодирующих все ферменты пути Вуда-Льюнгаля и восстановительного цикла трикарбоновых кислот соответственно. Геном *Pyrobaculum ferrireducens* содержит гены характерного для анаэробных гипертермофильных *Crenarchaeota* дикарбоксилат/4-гидроксипутиратного пути фиксации углекислого газа (Berg, 2011), однако, роста этого организма в авторотных условиях не наблюдалось. Облигатноорганотрофная бактерия *Deferrisoma camini* не обладает генами, ответственными за фиксацию CO₂. Механизмы восстановления Fe(III) в настоящее время окончательно не определены, однако, становится все более очевидным, что ключевую роль в нем играют мультигемовые цитохромы с, связанные с цитоплазматической мембраной, а также локализованные в периплазме или на внешней поверхности клетки (Richter et al., 2012; Breuer et al., 2015). Гены трансмембранных или находящихся с внешней стороны цитоплазматической мембраны цитохромов с были обнаружены у всех наших организмов. Наибольшим количеством таких цитохромов, включая мультигемовые с числом гемов 21-30, обладает *Deferrisoma camini*.

Таблица 24. Общая характеристика геномов новых железовосстанавливающих прокариот и предполагаемые детерминанты автотрофного роста и восстановления железа

Организм	<i>Geoglobus acetivorans</i>	<i>Pyrobaculum ferrireducens</i>	<i>Deferribacter autotrophicum</i>	<i>Deferrisoma camini</i>
Размер генома, Мб	1.86	2.47	2.54	4.24
Общее число генов	2276	2858	2561	3823
Гены, кодирующие белки, %	97.7	98.8	98.2	98.48
Гены, кодирующие белки с предсказанными функциями, %	68.7	56.9	74.2	78.9
Гены цитохромов с*	12	4	8	22
Количество Cys-Хаа-Хаа-Cys-His пептидных последовательностей в генах цитохромов с				
1	-	3	1	-
2-5	5	-	2	5
6-19	7	1	4	13
20+	-	-	1	4
Автотрофный рост	+	-	+	-
Гены, кодирующие ключевые ферменты фиксации CO ₂	Путь Вуда Льюнгдаля	Дикарбоксилат/ 4-гидроксибутиратный цикл	Восстановительный ЦТК	-

*связанные или находящиеся с внешней стороны цитоплазматической мембраны

6.3. Распространение новых железоредукторов

Анализ базы данных GenBank показал, что практически все близкородственные новым железоредукторам организмы получены из сходных экосистем, расположенных как относительно близко, так и на значительном удалении (Таблица 25). Так, все штаммы *Carboxydocella* выделены из горячих источников Камчатки; а представители рода *Geoglobus* получены из глубоководных морских гидротерм, расположенных в двух разных океанах, Атлантическом и Тихом.

Известные виды *Deferribacter* выделены из глубоководных морских гидротерм или из нефтяного месторождения. Местообитания близкородственных организмов также связаны с морскими гидротермами и месторождениями нефти и газа, расположенными в районе Срединно-Атлантического хребта, в Тихом океане у берегов Японии, в нефтяных месторождениях Дании и Великобритании в Северном море. Один флотип детектирован в горячих щелочных источниках на острове Амбитл в Папуа Новой Гвинее (Таблица 28). Культивируемые представители *Deferribacter* требуют наличия NaCl для роста, поэтому, возможно, что эти источники являются также и солеными, поскольку там же детектирован флотип, близкородственный другой морской бактерии, *Deferrisoma camini*. Типовой штамм *D. camini* был выделен из образца гидротермальной постройки спредингового центра Лау в юго-восточной части Тихого океана. Второй описанный вид рода был получен из мелководной морской гидротермы Средиземного моря, у берегов острова Милос. Организмы с более низким сходством генов 16S рНК (90-93%) были детектированы в существенно отличных экосистемах, включающих эстуарии рек и заболоченные местности в Китае (EF999371, FJ748774, JN038677, JN038676), соленые болота в южной Калифорнии (KF741397), осадки Желтого моря (EU617844), загрязненные тяжелыми металлами почвы в Китае (GQ487978), наземные грязевые вулканы в Тайване (JQ245524), почвы рисовых полей в Японии (AB672299).

Культивируемые представители гипертермофильного рода архей *Pyrobaculum* обитают преимущественно в наземных горячих источниках и сольфатарах, за исключением *P. aerophilum*, выделенного из мелководной морской гидротермы. В тех же экосистемах детектированы и близкородственные флотипы. Местообитания расположены в различных точках Земли, включая Исландию, юг Италии, США и Мексику, Дальний Восток России, Японию, Филиппины и Новую Зеландию (Таблица 25).

Таблица 25. Географическое распространение родов (по базе данных GenBank), в которые входят новые железоредукторы

Организм (номер в GenBank)	Длина, п.н.	% сходства гена 16S рРНК	Место обнаружения	Ссылка
<i>Pyrobaculum ferrireducens</i> (NR_134837)	1499		Гидротермальный источник, оз. Фумарольное, Узон, Камчатка, Россия	Mardanov et al., 2012
<i>Pyrobaculum neutrophilum</i> (NR_102765)	1495	99	Горячий источник Керлинггарфьолл, Исландия	NCBI RefSeq Targeted Loci Project
<i>Pyrobaculum islandicum</i> (NR_074372)	1496	99	Сольфатара, Исландия	NCBI RefSeq Targeted Loci Project
<i>Pyrobaculum aerophilum</i> (NR_102764)	1498	99	Мелководная морская гидротерма, Иския, Италия	Fitz-Gibbon et al., 2002
<i>Pyrobaculum igneiluti</i> (KU720559)	1503	98	Грязевой вулкан, геотермальная система озеро Солтон, Южная Калифорния, США	Lee et al., 2017
<i>Pyrobaculum calidifontis</i> (AB078332)	1495	98	Горячий источник, Каламба, Филиппины	Амо et al., 2002
<i>Pyrobaculum oguniense</i> (NR_112094)	1492	98	Горячий источник Оуни-хо, Япония	Sako et al., 2001
<i>Pyrobaculum organotrophum</i> (NR_112158)	1426	98	Сольфатара, Исландия	NCBI RefSeq Targeted Loci Project
<i>Pyrobaculum arsenaticum</i> (AJ277124)	1418	98	Сольфатара Пискарелли, Италия	Huber et al., 2000
<i>Pyrobaculum</i> sp. CBA150 (HM594679)	1429	98	Сольфатара	Roh, Bae, 2010. Неопубл.
<i>Pyrobaculum</i> sp. AQ1.S2 (DQ778007)	1407	97	<i>In situ</i> обрастания в горячем источнике, Роторуа, Новая Зеландия	Niederberger et al., 2008

Таблица 25 (Продолжение)

Некультивит. кренархеота рВА2 (AF176346)	1426	97	Наземная гидротерма, Национальный парк Йеллоустоун, США	Reysenbach et al., 2000
Некульт. <i>Thermoproteus</i> sp. AZ2 (KC749963)	1524	96	Геотермы, Национальный парк Лос Азуфрес, Мексика	Servin-Garciduenas et al., 2013. Неопубл.
<i>Carboxydocella</i> <i>manganica</i> (GU584133)	1522		Горячий источник Тростниковый, Узон, Камчатка, Россия	Slobodkina et al., 2012
<i>Carboxydocella</i> <i>thermautotrophica</i> (NR_025660)	1455	96	Горячий источник, Долина Гейзеров, Камчатка, Россия	Sokolova et al., 2002
<i>Carboxydocella</i> <i>sporoproducens</i> (NR_115306)	1418	95	Горячий источник, оз. Карымское, Камчатка, Россия	Slepova et al., 2006
' <i>Carboxydocella</i> <i>ferrireducens</i> ' 019 (EF092457)	1474	97	Горячий источник, Камчатка, Россия	Sokolova et al., 2007. Неопубл.
<i>Carboxydocella</i> sp. 1503 (EU260047)	1454	97	Горячий источник, Камчатка, Россия	Slepova et al., 2007
Некультивир. бактерия MAT_3016 (KJ806553)	1425	98	Природный образец	Ara et al., 2014. Неопубл.
<i>Geoglobus acetivorans</i> (FJ216404)	1417		Гидротермальная постройка поле Ашадзе, Срединно-Атлантический Хребет	Slobodkina et al., 2009
<i>Geoglobus ahangari</i> (AF220165)	1417	98	Гидротермальные осадки бассейна Гуаймас, Калифорнийский залив, Тихий океан, Мексика	Kashefi et al., 2002b

Таблица 25 (Продолжение)

Некультивир. архея ARC_OTU_55 (KP091030)	1460	96	Гидротермальные осадки бассейна Гуаймас, Калифорнийский залив, Тихий океан, Мексика	McKay et al., 2014 неопубл.
Некультивир. архея NT305-CAT-A04 (AB111488)	1318	97	<i>In situ</i> обрастания в глубоководных гидротермах, вулкан Суйо Идзу-Бонинский желоб, Тихий океан	Higashi et al., 2004
Некультивир. архея Pbsc2A03 (AB293221)	1284	96	Гидротермальная постройка, Южная Марианская впадина, Тихий океан	Kato et al., 2010
<i>Deferribacter autotrophicus</i> (EU407777)	1543		Гидротермальная постройка поле Ашадзе, Срединно-Атлантический Хребет	Slobodkina et al., 2009
<i>Deferribacter thermophilus</i> (U75602)	1551	95	Морское месторождение нефти Беатрис, Северное море, Великобритания	Greene et al., 1997
<i>Deferribacter abyssi</i> DR (AJ515881)	1537	98	Гидротермальная постройка поле Менез Гвен, Срединно-Атлантический Хребет	Miroshnichenko et al., 2003c
<i>Deferribacter abyssi</i> JR (NR_028995)	1519	98	Гидротермальная постройка поле Райнбоу, Срединно-Атлантический Хребет	Miroshnichenko et al., 2003c
<i>Deferribacter desulfuricans</i> (AB086060)	1446	95	Гидротермальная постройка, подводный вулкан Суйо, Идзу-Бонинский желоб, Тихий океан	Takai et al., 2003b
<i>Deferribacter</i> sp. RV1 (AB189456)	1550	95	Подводный вулкан Суйо, Тихий океан	Kuwabara, 2004. Неопубл
<i>Deferribacter</i> sp. ТКМ 55H-W4 (AB752313)	1445	95	<i>In situ</i> обрастания у главного выхода морской мелководной гидротермы Такетоми, Япония	Nunoura et al., 2013
<i>Deferribacter</i> sp. ABE-2n (JN856417)	1412	96	Морские глубоководные гидротермы	Wagner et al., 2011. Неопубл.

Таблица 25 (окончание)

Некультивир. бактерия 820 (AJ874313)	1514	96	Гидротермальная постройка поле Райнбоу, Срединно-Атлантический Хребет	Postec et al., 2007
Некультивир. бактерия 737 (AJ874309)	1530	96	Гидротермальная постройка поле Райнбоу, Срединно-Атлантический Хребет	Postec et al., 2007
Некультивир. бактерия PNG_Кар3_B190 (JF935175)	1469	96	Горячие щелочные источники, о. Амбитл, Папуа Новая Гвинея	Amend et al., 2011, неопубл
Некультивир бактерия NAK1-b1 (DQ867052)	1472	95	Месторождение газа (глубина 700-800 м), Япония	Mochimaru et al., 2007
Некультивир. бактерия (PWB085) FR744600	1482	95	Морское месторождение нефти Халфдан, Дания	Gittel et al., 2012
<i>Deferrisoma camini</i> (JF802205)	1503		Глубоководная гидротермальная постройка поле АВЕ, Лау Спрединг центр, Тихий океан	Slobodkina et al., 2012
<i>Deferrisoma paleochoriense</i> (KM386664)	1322	97	Осадки из морской мелководной гидротермы, бухта Палеохори, о. Милос, Греция	Perez-Rodriguez et al., 2016
Некультивир. бактерия PNG_Кар3_B503 (JF935195)	1502	97	Горячие щелочные источники, о. Амбитл, Папуа Новая Гвинея	Amend et al., 2011, неопубл

Таким образом, в нашей работе были выделены и охарактеризованы новые таксоны термофильных железоредукторов. Особый интерес представляют микроорганизмы, выделенные из глубоководных морских гидротерм, поскольку эта физиологическая группа прокариот в данных местообитаниях представлена лишь несколькими организмами. В частности, *Geoglobus acetivorans* стал вторым видом рода, а *Deferrisoma camini* образует отдельную филогенетическую ветвь в классе *Deltaproteobacteria*, имеет низкую степень сходства с ближайшими родственными организмами и может являться основой для нового семейства. Полученные новые виды железоредукторов, в основном, относятся к родам, для которых известна способность к восстановлению железа. В то же время для представителей рода *Carboxydocella* способность к восстановлению железа и марганца ранее показана не была. Штамм *Geoglobus acetivorans* SBH6^T является первым гипертермофилом, который был выделен с использованием ацетата в первичных накопительных культурах. Ацетат является ключевым продуктом разложения органического вещества в анаэробных условиях, и его утилизация обеспечивает полную минерализацию органического вещества. К началу нашей работы были известны всего два гипертермофильных организма, *Ferroglobus placidus* и *Geoglobus ahangari*, способные окислять ацетат, выделенные и поддерживаемые в культуре с пируватом в качестве донора электронов. Восстановление ферригидрита с ацетатом при 80°C в первичной накопительной культуре является прямым и непосредственным доказательством того, что природные, содержащиеся естественных условиях, количества клеток способны осуществлять полную минерализацию ацетата. Также было показано, что ферригидрит способен поддерживать литоавтотрофный рост некоторых железоредукторов (*Deferribacter autotrophicus*, *Carboxydocella manganica*), тогда как для роста с альтернативными акцепторами электронов необходимо наличие органических веществ что свидетельствует о сложных механизмах сопряжения и регуляции биохимических путей фиксации углерода и восстановления неорганических акцепторов электронов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Знания о биологическом разнообразии термофильных прокариот создают основу для понимания роли микроорганизмов в современных и древних термальных экосистемах и способствуют решению фундаментальных вопросов, связанных с происхождением, эволюцией и температурными границами жизни. В результате данной работы были выделены в чистую культуру, охарактеризованы и узаконены 17 новых таксонов термофильных анаэробных прокариот, в том числе 12 новых родов. Полученные организмы сопрягают восстановление соединений азота, серы, железа и марганца с окислением органических и неорганических веществ и могут участвовать во всех звеньях трофических цепей – от продукции первичного органического вещества до его полной минерализации.

Одной из повсеместно распространённых, однако мало изученных групп бактерий являются микроорганизмы, относящиеся к филуму *Planctomycetes*. Описано менее двух десятков родов, большая часть из которых представлена единственным видом. Выделение двух новых родов (*Thermogutta* и *Thermostilla*) увеличивает филогенетическое разнообразие этой группы бактерий. Данные, полученные при изучении физиологии этих первых термофильных планктомицетов, расширяют представления об экологической роли представителей филума *Planctomycetes*. Как показывают наши исследования, планктомицеты участвуют в разложении органического вещества, в частности, полисахаридов, не только при низких температурах и в аэробных условиях, но также могут выполнять эту функцию в экотопах с повышенными температурами. Сведения об анаэробном росте органотрофных планктомицетов носят фрагментарный и противоречивый характер (Hirsch and Müller, 1985; Kulichevskaya et al., 2007; Fukunaga et al., 2009), а данные о росте за счет восстановления нитрата отсутствуют. Мы продемонстрировали, что термофильные планктомицеты способны расти в анаэробных условиях, используя нитрат, нитрит или элементную серу в качестве конечного акцептора электронов, или без акцептора, за счет брожения.

Большая часть нашей работы посвящена исследованию хемолитоавторофных микроорганизмов. Выделенные нами термофильные литоавтотрофы могут использовать в

качестве доноров и акцепторов электронов газы, входящие в состав гидротермальных флюидов, такие как молекулярный водород или сернистый ангидрид, а также различные неорганические формы серы, железа и азота. Эти организмы потенциально могут осуществлять первичную продукцию органического вещества и таким образом формировать экосистемы, основанные на метаболизме всего нескольких простых неорганических веществ.

Хемолитоавтотрофные бактерии, сопрягающие рост с анаэробным окислением серы и восстановлением нитрата, связывают циклы углерода, азота и серы. При изучении этих бактерий был обнаружен новый путь микробной трансформации неорганических соединений – анаэробное окисление элементной серы нитратом с образованием аммония. Этот процесс представляет собой ранее неизвестный путь первичной продукции, который может давать преимущества в экосистемах с низким содержанием нитрата. Бактерии, осуществляющие этот процесс, филогенетически относятся к группам *Deltaproteobacteria* и *Thermodesulfobacteria*, члены которых ранее рассматривались как сульфатредукторы, не использующие нитрат. Полученные результаты меняют представление об экологической роли этих организмов.

Все бактерии, способные к окислению серы нитратом с образованием аммония, могут также диспропорционировать соединения серы. Диспропорционирование - одно из наименее изученных звеньев в биогеохимическом цикле серы. Неорганическое брожение соединений серы позволяет клетке получать энергию для роста за счёт использования лишь одного простого соединения в качестве, как донора, так и акцептора электронов. В случае с диоксидом серы, имеющим прямое вулканическое происхождение, такой процесс может играть особенно важную роль в первичной продукции органического вещества. Выделение бактерии, растущей за счет диспропорционирования сернистого газа (*Dissulfurirhabdus thermomarina*) является прямым доказательством возможности осуществления этого процесса. При изучении биоразнообразия хемолитотрофных прокариот, использующих сернистый газ, был также выделен и описан первый облигатный сульфитредуктор (*Thermodesulfitimonas autotrophica*), который растет за счёт восстановления сульфита или сернистого ангидрида в качестве акцептора электронов и не способен к использованию других неорганических акцепторов или брожению.

Значительную часть полученных в данной работе новых прокариот составляют железовосстанавливающие микроорганизмы. Диссимиляционное восстановление железа, возможно, относится к наиболее рано возникшим процессам микробного метаболизма. Число видов термофильных железоредукторов, обнаруженных в глубоководных морских гидротермах, исчисляется единицами, и выделение трех новых таксонов существенно дополняет знания о микробном биоразнообразии этих уникальных экосистем. Выделенные автотрофные железовосстанавливающие прокариоты окисляют молекулярный водород и восстанавливают нерастворимый оксид Fe(III) с образованием магнетита. Показано, что железоредукция играет важнейшую роль в метаболизме этих прокариот. Рост археи *Geoglobus acetivorans* облигатно зависит от Fe(III). *Deferrisoma camini* может использовать и элементную серу, однако Fe(III) в форме цитрата является предпочтительным акцептором электронов, значительно увеличивая скорость роста и конечную концентрацию клеток. Литоавтотрофный рост некоторых железоредукторов (например, *Deferribacter autotrophicus* и *Carboxydocella manganica*) поддерживается только ферригидритом, тогда как для роста с альтернативными акцепторами электронов им необходимо наличие органических веществ, что свидетельствует о сложных механизмах сопряжения и регуляции биохимических путей фиксации углерода и восстановления неорганических акцепторов электронов.

Результаты исследования расширили знания о филогенетическом и метаболическом разнообразии термофильных анаэробных прокариот, а также выявили способности новых микроорганизмов участвовать в биогеохимических циклах азота, серы и железа и их возможные экологические роли в современной и древнейшей биосферах Земли (Рисунок 31).

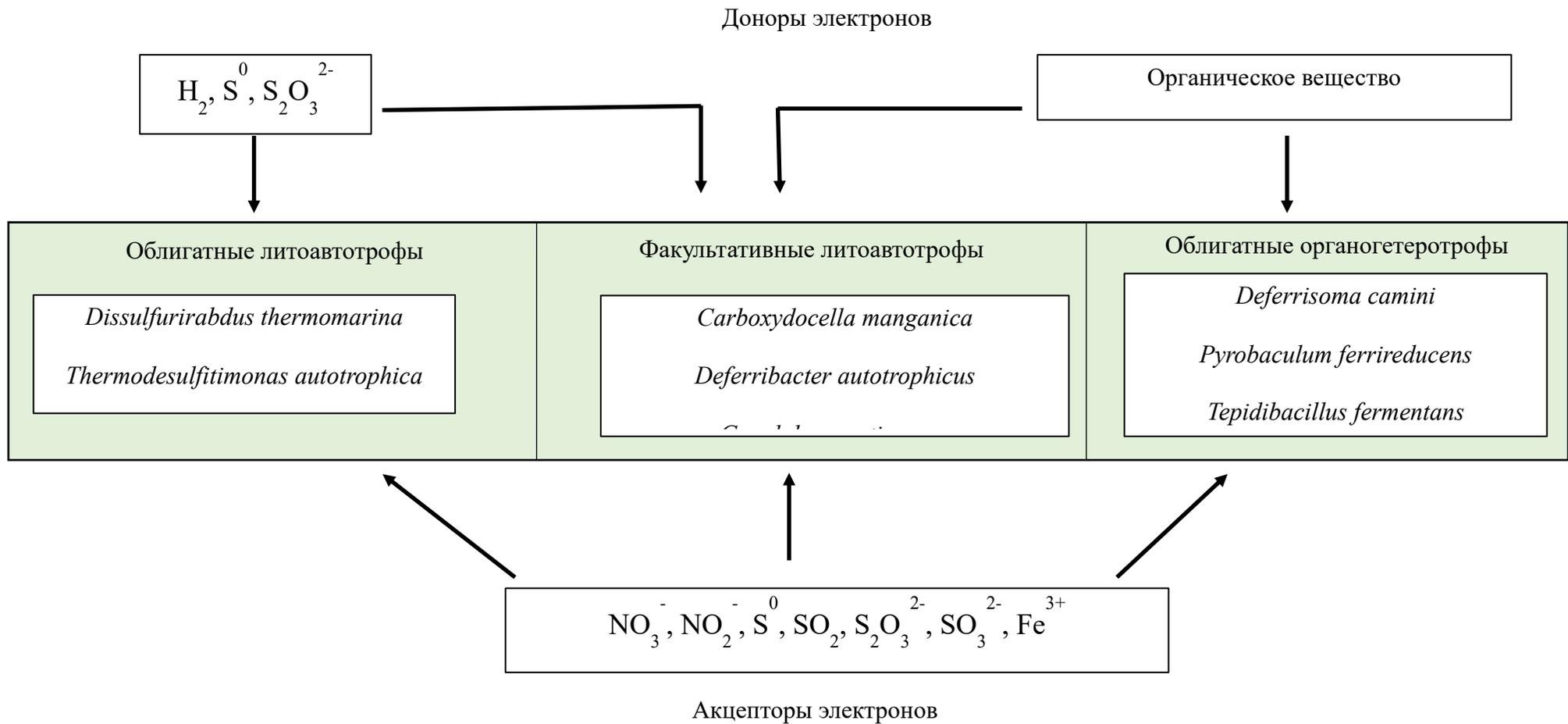


Рисунок 31. Новые термфильные прокариоты, использующие соединения азота, серы и железа в энергетическом метаболизме

ВЫВОДЫ

1. Расширены знания о филогенетическом и физиологическом разнообразии термофильных анаэробных прокариот. Описаны и узаконены 17 новых таксонов (в том числе 12 новых родов) термофильных и гипертермофильных бактерий и архей, использующих соединения азота, серы и железа в качестве доноров или акцепторов электронов в энергетическом метаболизме.
2. Впервые выделены в чистую культуру и охарактеризованы планктомицеты, имеющие оптимум роста при температурах выше 50°C (*Thermogutta* gen. nov., *Thermostilla* gen. nov.). Показана способность термофильных планктомицетов к анаэробному росту за счет восстановления нитрата и элементной серы. Природные местообитания термофильных планктомицетов включают подземные биотопы, континентальные горячие источники и мелководные морские гидротермы.
3. Обнаружен новый микробный процесс, связывающий циклы азота и серы - диссимиляционная аммонификация нитрата с использованием элементной серы в качестве донора электронов. Автотрофные микроорганизмы, осуществляющие этот процесс, могут служить первичными продуцентами органического вещества.
4. Показана способность бактерий, относящихся к филуму *Thermodesulfobacteria* и классу *Deltaproteobacteria*, анаэробно окислять соединения серы. Полученные данные меняют представление об экологической роли представителей этих филогенетических групп, которые ранее рассматривались как участники восстановительной части биогеохимического цикла серы.
5. Впервые продемонстрировано существование облигатных сульфитвосстанавливающих микроорганизмов. Из наземных горячих источников выделен и описан *Thermodesulfitimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov. Этот автотрофный представитель *Firmicutes* растет за счёт использования сульфита или

сернистого ангидрида в качестве акцептора электронов и не способен к восстановлению других неорганических соединений или брожению.

- б. Особенностью некоторых железовосстанавливающих прокариот является способность к литоавтотрофному росту только с ферригидритом, тогда как другие неорганические акцепторы обеспечивают рост этих прокариот исключительно в присутствии органических веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агеев В.А. Нетрадиционные и возобновляемые источники энергии (курс лекций): учеб. пособие / В.А. Агеев. — 2-е изд., перераб. и доп. — МРСУ. Саранск, 2014. — 184 с.
2. Ананьев В.П. Инженерная геология: Учеб. для строит, спец. вузов / В.П. Ананьев, А.Д. Потапов. — 3-е изд., перераб. и испр., — М.: Высш. шк., 2005. — 575 с.
3. Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1983. — 248 с.
4. Балашова В.В., Заварзин Г.А. (1979). Анаэробное восстановление окисного железа водородной бактерией // Микробиология. — 1979. — Т. 48. — С. 773-778.
5. Биология гидротермальных систем / Под ред. А.В. Гебрука М.: КМК Press, 2002. — 543 с.
6. Бримблекумб А.Д., Джикелз, П., Лисс, П. Введение в химию окружающей среды. Пер с англ. М.: Мир, 1999. — 271 с., ил.
7. Букин В.Н. Биосинтез витамина В₁₂ с помощью метанообразующих бактерий // Изв. АН СССР, серия биол. — 1962. — Т. 5. — С. 760.
8. Быховский В.Я., Панцхава Е.С. Биосинтез витамина В₁₂ метанообразующими бактериями / Сб.: Витаминные ресурсы и их использование. М.: Изд-во АН СССР, 1961. — Вып. 5.
9. Гаврилов С.Н., Слободкин А.И., Робб Ф.Т., Де Врис С. Характеристика мембраносвязанных Fe(III)—ЭДТА—редуктазных активностей термофильной грамположительной железовосстанавливающей бактерии *Thermoterrabacterium ferrireducens* // Микробиология. — 2007. — Т. 76. — С. 164-171.
10. Геологический словарь: в 2-х томах / Под ред. К. Н. Паффенгольца и др. — М.: Недра, 1978. — Т. 1 (А-М). — 486 с; Т. 2 (Н-Я). — 456 с.
11. Гиляров М.С. Биологический энциклопедический словарь / Гл. ред. М.С. Гиляров М.: Советская энциклопедия, 1989.
12. Головачева Р.С., Егорова Л.А., Логинова Л.Г. К экологии и систематике аэробных облигатно-термофильных бактерий, выделенных из термальных зон горы Янган-Тау и острова Кунашир Курильской гряды // Микробиология. — 1965. — Т. 34. — С. 801-807.
13. Головачева Р.С., Каравайко Г.И. *Sulfobacillus*, новый род термофильных спорообразующих бактерий // Микробиология. — 1978. — Т. 47. — С. 815-822.
14. Грабович М.Ю. Участие прокариот в круговороте серы // Соросовский Образовательный Журнал. — 1999. — №12. — С. 16–20.
15. Дворов И.М. Геотермальная энергетика. М.: Наука, 1976. — 192 с.
16. Дедыш С.Н., Куличевская И.Н. Планктомицеты: загадочные красавцы из мира бактерий // Природа. — 2010. — Т. 5. — С. 27-35.
17. Егорова Л.А., Дерюгина З.П. О спороносной термофильной тиобактерии *Thiobacillus thermophilica Imschenetski nov.sp.* // Микробиология. — 1963. — Т. 32. — С. 439.
18. Жилина Т.Н., Заварзин Г.А. Методы выделения и культивирования метанообразующих бактерий // Теоретические и методические основы изучения анаэробных микроорганизмов. Пущино. НЦБИ АН СССР. — 1978. — С. 68-90.
19. Заварзин Г.А. Бактерии и состав атмосферы. М., Наука, 1984. — 199 с.
20. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии. М., Наука, 2004. — 348 с.
21. Заварзин Г.А., Жилина Т.Н. Тионовые бактерии из термальных источников // Микробиология. — 1964. — Т. 33. — С. 844.
22. Заварзин Г.А., Карпов Г.А., Бонч-Осмоловская Е.А. и др. Кальдерные микроорганизмы. М., Наука, 1989. — 120 с.

23. Иванов М.И. Роль микроорганизмов в образовании отложений серы в сероводородных источниках Сергиевских минеральных вод // Микробиология. — 1957. — Т. 26. — С. 338.
24. Имшенецкий А.А. Микробиология анаэробного разложения целлюлозы. Выделение чистых культур термофильных целлюлозных бактерий. // Микробиология. — 1939. — Т. 8. — С. 129.
25. Исаченко Б.Д., Онучкова М.М., Предтеченская Б.Л., Липская Т.В. О самонагревании зерна // Докл. АН СССР. — 1934. — Т.1. — С. 507.
26. Каледин А. С., Слюсаренко А. Г., Городецкий С. И. Выделение и свойства ДНК-полимеразы из экстремально-термофильной бактерии *Thermus aquaticus* УТ-1. // Биохимия. — 1980. — Т. 45. — С. 644-651.
27. Коробкин В.И., Передельский Л.В. Экология. Ростов-на-Дону: Феникс, 2007. — 602 с.
28. Крайнов С.Р., Швец В.М. Гидрогеохимия. М.: Недра, 1992. — 463 с.
29. Кузнецов С.И., Иванов М.И., Ляликова Н.Н. Введение в геологическую микробиологию. М.: Изд-во АН СССР, 1962.
30. Кузнецов С.И. Биогеохимия серы // Изв. АН СССР, серия биол. — 1963. — Т. 5. — С. 668.
31. Логинова Л.Г. Сбраживание кукурузных кочерыжек термофильными целлюлозными бактериями. // Микробиология. — 1937. — Т. 6. — С. 1101.
32. Логинова Л.Г., Головачева Р.С., Егорова Л.А. Жизнь микроорганизмов при высоких температурах. Ин-т микробиологии АН СССР. М.: Наука, 1966. — 295 с.
33. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. / Пер. с англ. под ред. А.А. Баева и К.Г. Скрябина. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. — 480 с.
34. Методы общей бактериологии: в 3-х томах / Пер с англ. под ред. Ф. Герхардта и др. — М.: Мир, 1983. — 536 с.
35. Мирошниченко М.Л. Термофильные микробные сообщества глубоководных гидротерм // Микробиология. — 2004. — Т. 73. — С. 5-18.
36. Назина Т.Н., Шестакова Н.М., Григорян А.А., Михайлова Е.М., Турова Т.П., Полтараус А.Б., Циньсян Фен, Фангтиан Ни, Беляев С.С. (2006). Филогенетическое разнообразие и активность анаэробных микроорганизмов высокотемпературных горизонтов нефтяного месторождения Даган (КНР) // Микробиология. — 2006. — Т. 75. — С. 70–81.
37. Первозванский В., Чельцова Ю. О разложении целлюлозы бактериями. // Микробиология. — 1935. — Т. 4. — С. 262.
38. Первозванский В., Чельцова Ю. Сбраживание целлюлозы элективными культурами термофильных бактерий // Микробиология. — 1936. — Т. 5. — С. 385.
39. Перельман А.И. Геохимия ландшафтов. М.: Высш. школа, 1975. — 341 с.
40. Перфилова О.Ю., Махлаев М.Л., Геохимия биосферы. Электронное учебное пособие. Красноярск: ФГОУ ВПО КГАУ, 2009. — 196 с.
41. Пиневич А.В. Микробиология железа и марганца // Издательство Санкт-Петербургского университета, 2005, — 373 с.
42. Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод. М.: Недра, 1970.
43. Речкин А.И., Ладыгина Г.Н. Геохимическая роль микроорганизмов. Электронное учебное пособие. Нижний Новгород: НГУ, 2010. — 72 с.
44. Рогачева А.И. Новый метод бактериологического контроля на консервных заводах // Микробиология. — 1950. — Т. 19. — С. 239.
45. Ротмистров М.Н. Выделение чистых культур термофильных целлюлозных бактерий // Микробиология. — 1939. — Т. 8. — С. 56.

46. Ротмистров М.Н. Сбраживание растительных материалов чистыми и селективными культурами бактерий термофильного брожения целлюлозы // Микробиология. — 1940. — Т. 9. — С. 453.
47. Рунов Е.В. (1926). Восстановление окисных соединений железа биологическим путём // Вестник Бактериолого-Агрономической Станции. — 1926. — № 24. — С. 75-82. Издание Бактериолого-Агрономической Станции. Москва.
48. Светличный В.А., Соколова Т.Г., Герхардт М., Заварзин Г.А. Новая группа анаэробных термофильных карбоксидобактерий выделяющих водород // Докл АН СССР — 1990. — Т. 314. — С. 742-745.
49. Слободкин А.И., Ерощев-Шак В.А., Кострикина Н.А., Лаврушин В.Ю., Дайняк Л.Г., Заварзин Г.А. Образование магнетита термофильными анаэробными микроорганизмами // Доклады Академии Наук. — 1995. — Т. 345. — С. 694-697.
50. Слободкин А.И. Термофильная микробная металлоредукция // Микробиология. — 2005. — Т. 74. — С. 581-595.
51. Слободкин А.И., Заварзина Д.Г., Соколова Т.Г., Бонч-Осмоловская Е.А. Диссимиляционное восстановление неорганических акцепторов электронов термофильными анаэробными прокариотами // Микробиология. — 1999. — Т. 68. — С. 600-623.
52. Слободкин А.И., Слободкина Г.Б. Термофильные прокариоты из глубинных подземных местообитаний // Микробиология. — 2014. — Т. 83. — С. 255-271.
53. Слободкина Г.Б., Слободкин А.И., Турова Т.П., Кострикина Н.А., Бонч-Осмоловская Е.А. Обнаружение культивируемой гипертермофильной археи рода *Sulfophobococcus* в метантенке, работающем в термофильном режиме // Микробиология. — 2014. — Т. 73. — С. 716—720.
54. Слободкина Г.Б., Черных Н.А., Лопатин С.А., Ильина Г.Е., Банникова А.В., Анкенбауэр В., Эльдаров М.А., Варламов В.П., Бонч-Осмоловская Е.А. (2005). Выделение и характеристика термостабильной ДНК-полимеразы гипертермофильной археи *Thermococcus litoralis* Sh1AM // Прикладная биохимия и микробиология. — 2005. — Т.1. — С.40-47.
55. Слободкина Г.Б., Бонч-Осмоловская Е.А., Слободкин А.И. Восстановление хромата, селенита, теллурита и железа(III) умеренно-термофильной бактерией *Bacillus thermoamylovorans* штамм SKC-1. // Микробиология. — 2007. — Т. 76. — С. 602-607.
56. Чернова Н.М., Былова А.М. Общая экология. Учебник. М.: Дрофа, 2004. — 416 с.
57. Шварцев С.Л. Общая гидрогеология. М.: Недра, 1996. — 423 с.
58. Adams M.W.W. The biochemical diversity of life near and above 100°C in marine environments // J. Appl. Microbiol. — 1998. — Vol. 85. — P. 108S-117S.
59. Afkar E., Reguera G., Schiffer M., Lovley D.R. A novel *Geobacteraceae*-specific outer membrane protein J (OmpJ) is essential for electron transport to Fe(III) and Mn(IV) oxides in *Geobacter sulfurreducens* // BMC Microbiol. — 2005. — Vol. 5. — P. 41.
60. Afshar S., Johnson E., de Vries S., Schroder I. Properties of a thermostable nitrate reductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum* // J. Bacteriol. — 2001. — Vol. 183. — P. 5491–5495.
61. Aguiar P., Beveridge T.J. Reysenbach A.-L. (2004). *Sulfurihydrogenibium azorense*, sp. nov., a thermophilic hydrogen-oxidizing microaerophile from terrestrial hot springs in the Azores // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2004. — Vol. 54. — P. 33–39.
62. Alain K., Querellou J., Lesongeur F., Pignet P., Crassous P., Raguénès G., Cuff V., Cambon-Bonavita M.A. *Caminibacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen—oxidizing bacterium isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2002. — Vol. 52. — P. 1317–1323.
63. Alain K., Rolland S., Crassous P., Lesongeur F., Zbinden M., Le Gall C., Godfroy A., Page A., Juniper S.K., Cambon-Bonavita M.A., Duchiron F., Querellou J.

- Desulfurobacterium crinifex* sp. nov., a novel thermophilic, pinkish—streamer forming, chemolithoautotrophic bacterium isolated from a Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent and amendment of the genus *Desulfurobacterium* // *Extremophiles*. — 2003. — Vol. 7. — P. 361–370.
64. Allen M.B. The thermophilic aerobic sporeforming bacteria // *Bacteriol. Revs.* — 1953. — Vol. 17. — P. 125.
 65. Alves J.I., van Gelder A.H., Alves M.M., Sousa D.Z., Plugge C.M. *Moorella stamsii* sp. nov., a new anaerobic thermophilic hydrogenogenic carboxydrotroph isolated from digester sludge // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2013. — Vol. 63. — P. 4072–4076.
 66. Amend J.P., Shock E.L. Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic *Archaea* and *Bacteria* // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2001. — Vol. 25. — P. 175–243.
 67. Amin A., Ahmed I., Salam N., Kim B.-Y., Singh D., Zhi X.-Y., Xiao M., Li W.-J. Diversity and distribution of thermophilic bacteria in hot springs of Pakistan // *Microb. Ecol.* — 2017. — DOI 10.1007/s00248-017-0930-1.
 68. Amo T., Paje M.L.F., Inagaki A., Ezaki S., Atomi H., Imanaka T. *Pyrobaculum calidifontis* sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon that grows in atmospheric air // *Archaea*. — 2002. — Vol. 1. — P. 113–121.
 69. Ansorge W.J. Next-generation DNA sequencing techniques // *Nat. Biotechnol.* — 2009. — Vol. 25. — P. 195–203.
 70. Appia-Ayme C., Little P.J., Matsumoto Y., Leech A.P., Berks B.C. Cytochrome complex essential for photosynthetic oxidation of both thiosulfate and sulfide in *Rhodovulum sulfidophilum* // *J. Bacteriol.* — 2001. — Vol. 183. — P. 6107–6118.
 71. Aravind L., Tatusov R.L., Wolf Y.I., Walker D.R., Koonin E.V. Evidence for massive gene exchange between archaeal and bacterial hyperthermophiles // *Trends Genet.* — 1998. — Vol. 11. — P. 442–444.
 72. Ashkin A., Dziedzic J.M. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria // *Science*. — 1987. — Vol. 235. — P. 1517–1520.
 73. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool // *J. Mol. Biol.* — 1990. — Vol. 215. — P. 403–410.
 74. Bak F., Cypionka H. A novel type of energy metabolism involving fermentation of inorganic sulphur compounds // *Nature*. — 1987. — Vol. 326. — P. 891–892.
 75. Bak F., Pfennig N. Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio sulfodismutans* sp. nov. by disproportionation of inorganic sulfur compounds // *Arch. Microbiol.* — 1987. — Vol. 147. — P. 184–189.
 76. Balk M., van Gelder T., Weelink S.A., Stams A.J.M. (Per)chlorate reduction by the thermophilic bacterium *Moorella perchloratireducens* sp. nov., isolated from underground gas storage // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2008. — Vol. 74. — P. 403–409.
 77. Balkwill D.L., Kieft T.L., Tsukuda T., Kostandarithes H.M., Onstott T.C., Macnaughton S., Bownas J., Fredrickson J.K. Identification of iron-reducing *Thermus* strain as *Thermus scotoductus* // *Extremophiles*. — 2004. — Vol. 8. — P. 37–44.
 78. Barbier G., Godfroy A., Meunier J.R., Querellou J., Cambon M.A., Lesongeur F., Grimont P.A.D., Raguénès G. *Pyrococcus glycovorans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from the East Pacific Rise // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 1999. — Vol. 49. — P. 1829–1837.
 79. Barton L.L., Fardeau M.-L., Fauque G.D. Hydrogen sulfide: a toxic gas produced by dissimilatory sulfate and sulfur reduction and consumed by microbial oxidation // *Met. Ions Life Sci.* — 2014. — Vol. 14. — P. 237–277.
 80. Basso O., Lascourrèges J.-F., Jarry M., Magot, M. The effect of cleaning and disinfecting the sampling well on the microbial communities of deep subsurface water samples // *Environ. Microbiol.* — 2005. — Vol. 7. — P. 13–21.

81. Baur M.E., Hayes J.M., Studley S.A., Walter M.R. Millimeter-scale variations of stable isotope abundances in carbonates from banded iron-formations in the Hamersley Group of Western Australia // *Econ. Geol.* — 1985. — Vol. 80. — P. 270–282.
82. Beijerinck M.W. Die Bacterien der Papillionaceen Knoellchen // *Bot Zeitung* — 1888. — Vol. 46. — P. 797–804. (Цитируется по Jetten M.S. The microbial nitrogen cycle // *Environ. Microbiol.* — 2008. — Vol. 1. — P. 2903–2909).
83. Beijerinck M.W. Über *Spirillum desulfuricans* als Ursache von Sulfat-reduktion // *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung I.* — 1895. — №1. — P. 104–114.
84. Beijerinck M.W. Über oligonitrophile Mikroben // *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung II.* — 1901. — №. 7. — P. 561–582.
85. Beffa T., Blanc M., Aragno M. Obligately and facultatively autotrophic, sulfur- and hydrogen-oxidizing thermophilic bacteria isolated from hot composts // *Arch. Microbiol.* — 1996. — Vol. 165. — P. 34–40.
86. Belkin S., Wirsén C.O., Jannasch H.W. Biological and abiological sulfur reduction at high temperatures // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1985. — Vol. 49. — P. 1057–1061.
87. Ben Hania W., Postec A., Aüllo T., Ranchou-Peyruse A., Erauso G., Brochier-Armanet C., Hamdi M., Ollivier B., Saint-Laurent S., Magot M., Fardeau M.-L. *Mesotoga infera* sp. nov., a mesophilic member of the order *Thermotogales*, isolated from an underground gas storage aquifer // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2013. — Vol. 63. — P. 3003–3008.
88. Benson D.A., Boguski M., Lipman, D.J., Ostell, J., Ouellette B.F., Rapp B.A., Wheeler D.L. GenBank // *Nucleic Acids Res.* — 1999. — Vol. 27. — P. 12–17.
89. Berg I.A. Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2011. — Vol. 77. — P. 1925–1936.
90. Bezsudnova E.Y., Petrova T.E., Artemova N.V., Boyko K.M., Shabalin I.G., Rakitina T.V., Polyakov K.M., Popov V.O. NADP-Dependent aldehyde dehydrogenase from Archaeon *Pyrobaculum* sp.1860: structural and functional features // *Archaea.* — 2016. — Vol. 10. — 2016:9127857. eCollection 2016.
91. Bhowmick D.C., Bal B., Chatterjee N.S., Ghosh A.N., Pal S. 2009. A low-GC Gram-positive *Thermoanaerobacter*-like bacterium isolated from an Indian hot spring contains Cr(VI) reduction activity both in the membrane and cytoplasm // *J. Appl. Microbiol.* — 2009. — Vol. 106. — P. 2006–2016.
92. Blöchl E., Rachel R., Burggraf S., Hafenbradl D., Jannasch, H.W., Stetter, K.O. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C // *Extremophiles.* — 1997. — Vol. 1. — P. 14–21.
93. Boedeker C., Schüler M., Reintjes G., Jeske O., van Teeseling M.C.F., Jogler M., Rast P., Borchert D., Devos D.P., Kucklick M., Schaffer M., Kolter R., van Niftrik L., Engelmann S., Amann R., Rohde M., Engelhardt H., Jogler C. Determining the bacterial cell biology of Planctomycetes // *Nature Com.* — 2017. —| DOI: 10.1038/ncomms14853
94. Bonch-Osmolovskaya E. A., Sokolova T.G., Kostrikina N.A., Zavarzin G.A. *Desulfurella acetivorans* gen. nov., sp. nov. - a new thermophilic sulfur-reducing eubacterium // *Arch. Microbiol.* — 1990. — Vol. 153. — P. 151–155.
95. Bonch-Osmolovskaya E.A., Miroshnichenko M.L., Lebedinsky A.V., Chernyh N.A., Nazina T.N., Ivoilov V.S., Belyaev S.S., Boulygina E.S., Lysov Yu.P., Perov A.N., Mirzabekov A.D., Hippe H., Stackebrandt E., L'Haridon S., Jeanthon Ch. Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2003. — Vol. 69. — P. 6143–6151.

96. Bonch-Osmolovskaya E.A. Metabolic diversity of thermophiles – what’s new? / In: “Extremophiles: Microbiology and Biotechnology”. Ed.: R. Anitori. Horizon Press, 2011.
97. Bonilla Salinas M., Fardeau M.-L., Cayol J.-L., Casalot L., Patel B.K.C., Thomas P., Garcia J.-L., Ollivier B. *Petrobacter succinatimandens* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic, nitrate-reducing bacterium isolated from an Australian oil well // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2004. — Vol. 54. — P. 645-649.
98. Boone D. R., Liu Y., Zhao Z.J., Balkwill D.L., Drake G.R., Stevens T.O., Aldrich, H.C. *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe(III)- and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface // *Int. J. Syst. Bacteriol.* —1995. — Vol. 45. — P. 441-448.
99. Boone D.R. 2001. Genus IV. *Methanothermobacter* Wasserfallen, Nölling, Pfister, Reeve, Conway de Macario 2000. In *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. D.R. Boone, R.W. Castenholz & G.M. Garrity, Eds.: 230–233. Springer—Verlag. New York, NY.
100. Borgonie G., García-Moyano A., Litthauer D., Bert W., Bester A., van Heerden E., Möller C., Erasmus M., Onstott T.C. (2011) Nematoda from the terrestrial deep subsurface of South Africa // *Nature.* — 2011. — Vol. 474 — P. 79–82.
101. Bouleègue J. Solubility of elemental sulfur in water at 298 K // *Phosphorus Sulfur.* — 1978. — Vol. 5 — P. 127-128.
102. Boussau B., Blanquart S., Necsulea A., Lartillot N., Gouy M.(2008a).Parallel adaptations to high temperatures in the Archaeaeon // *Nature.* — 2008. — Vol. 456 — P. 942–945.
103. Bouzas T.M., Barros-Velázquez J., Villa T.G. Industrial applications of hyperthermophilic enzymes: a review // *Protein & Peptide Lett.* — 2006. — Vol. 13. — P. 645-651.
104. Brenner S., Horne R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses // *Biochimica and Biophysica Acta* — 1959. — Vol. 134 — P. 103-110.
105. Bridger S.L., Clarkson S.M., Stirrett K., DeBarry M.B., Lipscomb G.L., Schut G.J., Westpheling J., Scott R.A., Adams M.W. 2011. Deletion strains reveal metabolic roles for key elemental sulfur-responsive proteins in *Pyrococcus furiosus* // *J. Bacteriol.* — 2011. — Vol. 193 — P. 6498–6504.
106. Broda E. Two kinds of lithotrophs missing in nature // *Allg. Mikrobiol.* — 1977. — Vol. 17 — P. 491-493.
107. Brock T.D. Life at high temperatures // *Science.* — 1967. — Vol. 158 — P. 1012—1019.
108. Brock T.D., Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile // *J. Bacteriol.* — 1969. — Vol. 98. — P. 289-297.
109. Brock, T.D., Brock, K.M., Belly, R.T., Weiss R.L. *Sulfolobus*: a new genus of sulphur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature // *Arch. Microbiol.* — 1972. — Vol. 84. — P. 54–68.
110. Brock T.D., Gustafson J. Ferric iron reduction by sulfur- and iron-oxidizing bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* —1976. — Vol. 32. — P. 567—571.
111. Brock T.D. The value of basic research: discovery of *Thermus aquaticus* and other extreme thermophiles // *Genetics.* —1997. — Vol. 146. — P. 1207-1210.
112. Brooks M.L. Effects of increased soil nitrogen on the dominance of alien annual plants in the Mojave Desert // *J. Appl. Ecol.* —2003. — Vol. 40. — P. 344-353.
113. Breuer M., Rosso K.M., Blumberger J., Butt J.N. Multi-haem cytochromes in *Shewanella oneidensis* MR-1: structures, functions and opportunities // *J. R. Soc. Interface.* — 2015. —Vol. 12. — 20141117.

114. Burggraf S., Jannasch H.W., Nicolaus B., Stetter K.O. *Archaeoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfur-reducing *Archaeobacteria* // Syst. Appl. Microbiol. — 1990. — Vol. 13, — P. 24–28.
115. Butler J.E., Young N.D., Lovley D.R. Evolution of electron transfer out of the cell: comparative genomics of six *Geobacter* genomes // BMC Genomics. — 2010. — Vol.11. — P. 40.
116. Byrne-Bailey K.G., Wrighton K.C., Melnyk R.A., Agbo P., Hazen T.C., Coates J.D. Complete genome sequence of the electricity-producing “*Thermincola potens*” strain JR // J. Bacteriol. — 2010. — Vol. 192. — P. 4078–4079.
117. Cabello P., Roldan M.D., Moreno-Vivian C. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea // Microbiology. — 2004. — Vol. 150. — P. 3527–3546.
118. Caldwell D.E., Caldwell S.J., Laycock J.P. *Thermothrix thiopara* gen. et sp. nov., a facultatively anaerobic facultative chemolithotroph living at neutral pH and high temperature // Can. J. Microbiol. — 1976 — Vol. 22. — P. 1509-1517.
119. Campbell L.L., Postgate J.R. Classification of the spore-forming sulfate-reducing bacteria // Bacteriol. Rev. — 1965. — Vol. 29. — P. 359—363.
120. Campbell B.J., Smith J.L., Hanson T.E., Klotz M.G., Stein L.Y., Lee C.K., Wu D., Robinson J.M., Khouri H.M., Eisen J.A., Cary S.C. Adaptations to submarine hydrothermal environments exemplified by the genome of *Nautilia profundicola* // PLoS Genet. — 2009. — Vol. 5, № 2. — e1000362.
121. Canfield D. E. The evolution of the Earth surface sulfur reservoir // Am. J. Sci. — 2004. — Vol. 304. — P. 839–861.
122. Canfield D.E., Rosing M.T., Bjerrum C. Early anaerobic metabolisms // Phil. Trans. R. Soc. B. — 2006. — Vol. 361. — P. 1819–1836.
123. Canganella F., Wiegel J. Anaerobic thermophiles // Life. — 2014. — Vol. 4. — P. 77-104.
124. Cariello N.F., Swenberg J.A., Skopek T.R. Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis // Nucleic Acids Res. — 1991. — Vol. 19. — P. 4193–4198.
125. Carlson H.K., Iavarone A.T., Gorur A., Yeo B.S., Tran R., Melnyk R.A., Mathies R.A., Auer M., Coates J.D. 2012. Surface multiheme c-type cytochromes from *Thermincola potens* and implications for respiratory metal reduction by Gram-positive bacteria // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2012. — Vol. 109. — P. 1702–1707.
126. Casamayor E.O., Schäfer H., Bañeras L., Pedrós-Alió C., Muyzer G. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis // Appl. Environ. Microbiol. — 2000. — Vol. 66. — P. 499-508.
127. Castresana J., Saraste M., 1995. Evolution of energetic metabolism: the respiration – early hypothesis // Trends in Biochemical Sciences. — 1995. — Vol. 20. — P. 443-448.
128. Chaney A. L., Marbach E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia // Clin. Chem. — 1962. — Vol. 8. — P. 130–132.
129. Chatterjee S., Bhattacharjee .I, Chandra G. Biosorption of heavy metals from industrial wastewater by *Geobacillus thermodenitrificans* // J. Hazard. Mater. — 2010. — Vol.17. — P. 117–125.
130. Chen C.L., Macarie H., Ramirez I., Olmos A., Ong S.L., Monroy O. Liu W.T. Microbial community structure in a thermophilic anaerobic hybrid reactor degrading terephthalate // Microbiology — 2004. — Vol. 150. — P. 3429-3440.
131. Cheney E.W. Study of microorganisms found in merchantable canned foods // Jour. Med. Res. — 1919. — Vol. 40. — P. 177.
132. Chien A., Edgar D., Trela J. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophilic *Thermus aquaticus* // J. Bacteriol. — 1976. — Vol. 127. — P. 1550–1557.

133. Childers S.E., Ciufo S., Lovley D.R. *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis // *Nature*. — 2002. — Vol. 416. — P. 767–769.
134. Chun J., Lee J.-H., Jung Y., Kim M., Kim S., Kim B.K., Lim Y.W. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2007. — Vol. 57. — P. 2259–2261.
135. Chung K.-T., Bryant M.P. Robert E. Hungate: pioneer of anaerobic microbial ecology // *Anaerobe*. — 1997. — Vol. 3. — P. 213–217.
136. Cole J.A., Brown C.M. Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria: a short circuit in the biological nitrogen cycle // *FEMS Microbiol. Lett.* — 1980. — Vol. 7. — P. 65–72.
137. Colwell F.S., Onstott T.C., Delwiche M.E., Chandler D., Fredrickson J.K., Yao Q.J., McKinley J.P., Bone D.R., Griffiths R., Phelps T.J., Ringelberg D., White D.C., LaFreniere L., Balkwill D., Lehman R.M., Konisky J., Long P.E. 1997. Microorganisms from deep, high temperature sandstones: constraints on microbial colonization // *FEMS Microbiol. Rev.* — 1997. — Vol. 20. — P.425–435.
138. Coorevits A., Dinsdale A.E., Halket G., Lebbe L., De Vos P., Van Landschoot A., Logan N.A. Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly ‘*thermoglucosidasius*’); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp.nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2011. — Vol. 62. — P. 1470–1485.
139. Corliss J.B., Dymond J., Gordon L.I., Edmond J.M., von Herzen R.P., Ballard R.D., Green K., Williams D., Bainbridge A., Crane K., van Andel T.H. Submarine thermal springs on the Galapagos Rift // *Science*. — 1979. — Vol. 203. — P. 1073–1083.
140. Covington E.D., Gelbmann C.B., Kotloski N.J., Gralnick J.A. 2010. An essential role for UshA in processing of extracellular flavin electron shuttles by *Shewanella oneidensis* // *Mol. Microbiol.* — 2010. — Vol. 78. — P. 519–532.
141. Cross T. Thermophilic actinomycetes // *J. Appl. Bacteriol.* — 1968. — Vol. 31. — P. 36–53.
142. Dahl C., Trüper H. G. Sulfite reductase and APS reductase from *Archaeoglobus fulgidus* // *Methods in Enzymol.* — 2001. — Vol. 331. — P. 427–441.
143. 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* // *J. Bacteriol.* — 2005. — Vol. 187. — P. 1392–1404.
144. Dahl C., Franz B., Hensen D., Kesselheim A., Zigann R. Sulfite oxidation in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: identification of SoeABC as a major player and relevance of SoxYZ in the process // *Microbiology* — 2013. — Vol. 159. — P. 2626–2638.
145. Dahl C. Cytoplasmic sulfur trafficking in sulfur-oxidizing prokaryotes // *Int. Un. Biochem. Mol. Biol.* — 2015. — Vol. 67. — P. 268–274.
146. Dahle H., Garshol F., Madsen M., Birkeland N.-K. Microbial community structure analysis of produced water from a high-temperature North Sea oil-field // *Antonie van Leeuwenhoek*. — 2008. — Vol. 93. — P. 37–49.
147. Daims H., Lebedeva E.V., Pjevac P., Han P., Herbold G., Albertsen M., Jehmlich N., Palatinszky M., Vierheilig J., Bulaev A., Kirkegaard R.H., von Bergen M., Rattei T., Bendinger B., Nielsen P.H., Wagner M. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria // *Nature*. — 2015. — Vol. 528(7583). — P. 504–509.

148. DeCastro M.-E., Rodríguez-Belmonte E., González-Siso M.-I. Metagenomics of thermophiles with a focus on discovery of novel thermozymes // *Front. Microbiol.* — 2016. — Vol. 7. — P.1521. doi: 10.3389/fmicb.2016.01521
149. de Vries S., Schröder I. Comparison between the nitric oxide reductase family and its aerobic relatives, the cytochrome oxidases // *Biochem. Soc. Trans.* — 2002. — Vol. 30. — P. 662–667.
150. de Vries S., Momcilovic M., Strampraad M.J.F., Whitelegge J.P., Baghai A., Schröder I. Adaptation to a high-tungsten environment: *Pyrobaculum aerophilum* contains an active tungsten nitrate reductase // *Biochemistry.* — 2010. — Vol. 49. — P. 9911–9921.
151. DiChristina T., Hoffmann M., Arnold R. G., Lidstrom M. E. Dissimilative Fe(III) reduction by the marine eubacterium *Alteromonas putrefaciens* 200 // *Water Sci. Technol.* — 1988. — Vol. 20. — P. 69-79.
152. Dipippo J.L., Nesbø C.L., Dahle H., Doolittle W.F., Birkeland N.-K., Noll K.M. *Kosmotoga olearia* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, anaerobic heterotroph isolated from an oil production fluid // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2009. — Vol. 59. — P. 2991-3000.
153. Dirmeier R., Keller M., Haffenbradl D., Braun F.J., Rachel R., Burggraf S., Stetter K.O. *Thermococcus acidaminovorans* sp. nov., a new hyperthermophilic alkalophilic archaeon growing on amino acids // *Extremophiles.* — 1998. — Vol. 2. — P. 109-114.
154. Donk P. J. A highly resistant thermophilic organism // *Jour. Bact.* — 1920. — Vol. 5 — P. 373.
155. Duce R.A., LaRoche J., Altieri K., Arrigo K.R., Baker A.R., Capone D.G., Cornell S., Dentener F., Galloway J., Ganeshram R.S., Geider R.J., Jickells T., Kuypers M.M., Langlois R., Liss P.S., Liu S.M., Middelburg J.J., Moore C.M., Nickovic S., Oschlies A., Pedersen T., Prospero J., Schlitzer R., Seitzinger S., Sorensen L.L., Uematsu M., Ulloa O., Voss M., Ward B., Zamora L. Impacts of atmospheric anthropogenic nitrogen on the open ocean // *Science.* — 2008. — Vol. 320. — P. 893–897.
156. Ducluzeau A.-L., van Lis R., Duval S., Schoepp-Cothenet B., Russell M.J., Nitschke W. Was nitric oxide the first deep electron sink? // *Trends in Biochemical Sciences.* — 2009. — Vol. 34. — P. 9–15.
157. Dworkin M. Sergei Winogradsky: a founder of modern microbiology and the first microbial ecologist // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2012. — Vol. 36. — P. 364–379.
158. Elkins J.G., Podar M., Graham D.E., Makarova K.S., Wolf Y., Randau L., Hedlund B.P., Brochier-Armanet C., Kunin V., Anderson I., Lapidus A., Goltsman E., Barry K., Koonin E.V., Hugenholtz P., Kyrpides N., Wanner G., Richardson P., Keller K., Stetter K.O. A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the archaea // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2008. — Vol. 15. — P. 8102–8107.
159. Elshahed M.S., Youssef N.H., Luo Q., Najar F.Z., Roe B.A., Sisk, T.M., Bühring S.I., Hinrichs K.-U., Krumholz L.R. Phylogenetic and metabolic diversity of *Planctomycetes* from anaerobic, sulfide- and sulfur-rich Zodletone spring, Oklahoma // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2007 — Vol. 73. — P. 4707–4716.
160. Enebo L. On three bacteria connected with thermophilic cellulose fermentation // *Physiologia plantarum.* — 1951. — Vol. 4. — P. 652.
161. Emoto Y., Yoneda Y. 1962. Bacteria and algae of hot spring in Toyama prefecture // *Acta Phytotaxonomica et geobotanica.* — 1962. — Vol. XI (1). — P. 7-26.
162. Euzéby J.P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 1997. — Vol. 47. — P. 590–592. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net>).
163. Fardeau M.-L., Barsotti V., Cayol J.-L., Guasco S., Michotey V., Joseph M., Bonin P., Ollivier B. *Caldinitratiruptor microaerophilus*, gen. nov., sp. nov. isolated from a French hot spring (Chaudes-Aigues, Massif Central): a novel cultivated facultative

- microaerophilic anaerobic thermophile pertaining to the Symbiobacterium branch within the Firmicutes // *Extremophiles*. — 2010. — Vol. 14. — P.241-247.
164. Fauque G.D. (1994) Sulfur reductase from thiophilic sulfate-reducing bacteria // *Methods Enzymol.* — 1994. — Vol. 243. — P. 353-367.
165. Fauque G.D., Klimmek O., Kroger A. Sulfur reductase from spirilloid mesophilic sulfur-reducing eubacteria // *Methods Enzymol.* — 1994. — Vol. 243. — P. 367–383.
166. Feinberg L. F., Holden J. F. Characterization of dissimilatory Fe(III) versus NO₃ reduction in the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum* // *J. Bacteriol.* — 2006. — Vol. 188. — P. 525–531.
167. Feng X.H., Liu F., Tan W.F., Liu X.W. Synthesis of birnessite from the oxidation of Mn²⁺ by O₂ in alkali medium: effects of synthesis conditions // *Clays Clay Miner.* — 2004. — Vol. 52 — P. 240–250.
168. Finster K. Microbiological disproportionation of inorganic sulfur compounds // *J. Sulfur Chem.* — 2008. — Vol. 29. — P. 281–292.
169. Finster K.W., Kjeldsen K.U., Kube M., Reinhardt R., Musmann M., Amann R. Schreiber L. Complete genome sequence of *Desulfocapsa sulfexigens*, a marine deltaproteobacterium specialized in disproportionating inorganic sulfur compounds // *Standards in Genomic Sciences.* — 2013. — Vol. 8. — P. 58-68.
170. Flores G.E., Liu Y., Ferrera I., Beveridge T.J., Reysenbach A. -L. *Sulfurihydrogenibium kristjanssonii* sp. nov., a hydrogen- and sulfur-oxidizing thermophile isolated from a terrestrial Icelandic hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2008, — Vol. 58. — P. 1153-1158.
171. Flores G.E., Campbell J.H., Kirshtein J.D., Meneghin J., Podar M., Steinberg J.I., Seewald J.S., Tivey M.K., Voytek M.A., Yang Z.K., Reysenbach A. -L. Microbial community structure of hydrothermal deposits from geochemically different vent fields along the Mid-Atlantic Ridge // *Environ. Microbiol.* — 2011. — Vol. 13. — P. 2158–2171.
172. Flores G.E., Shakya M., Meneghin J., Yang Z. K., Seewald J.S., Wheat C.G., Podar M., Reysenbach A. -L. Inter-field variability in the microbial communities of hydrothermal vent deposits from a back-arc basin // *Geobiology*. — 2012. — DOI: 10.1111/j.1472-4669.2012.00325.x
173. Fontaine F.E., Peterson W.H., McCoy E., Johnson M.J., Ritter G.J. A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum* n. sp. // *J. Bacteriol.* — 1942. — Vol. 43. — P. 701-715.
174. Franz B., Lichtenberg H., Hormes J., Modrow H., Dahl C., Prange A. Utilization of solid “elemental” sulfur by the phototrophic purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: a sulfur K-edge XANES spectroscopy study // *Microbiology* — 2007. — Vol. 153. — P. 1268–1274.
175. Frederiksen T.M., Finster K. The transformation of inorganic sulfur compounds and the assimilation of organic and inorganic carbon by the sulfur disproportionating bacterium *Desulfocapsa sulfoexigens* // *Antonie van Leeuwenhoek*. — 2004. — Vol. — 85. — P. 141-149.
176. Fredrickson J. K. DOE explores subsurface biosphere // *ASM News* . — 1992. — Vol. 58. — P. 183.
177. Friedrich C.G., Rother D., Bardischewsky F., Quentmeier A., Fischer J. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2001. — Vol. 67. — P. 2873–2882.
178. Friedrich C.G., Bardischewsky F., Rother D., Quentmeier A., Fischer J. Prokaryotic sulfur oxidation // *Curr.Opin.Microbiol.* — 2005. — Vol. 8. — P. 253–259.
179. Frigaard N.-U., Dahl C. Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria // *Adv. Microb. Physiol.* — 2009. — Vol. 54. — P. 103-200.

180. Fuchs T., Huber H., Teiner K., Burggraf S., Stetter K.O. 1995. *Metallosphaera prunae* sp. nov., a novel metal-mobilizing, thermoacidophilic Archaeum, isolated from a uranium-mine in Germany // Syst. Appl. Microb. — 1995. — Vol. 18. — P. 550-556.
181. Fuchs G. Alternative pathways of carbon dioxide fixation: Insights into the early evolution of life? // Annu Rev. Microbiol. — 2011. — Vol. 65. — P. 631–658.
182. Fuciños P., Pastrana L., Sanromán A., Longo M.A., Hermoso J.A., Rúa M.L. An esterase from *Thermus thermophilus* HB27 with hyper-thermoalkalophilic properties: purification, characterisation and structural modelling // J. Mol. Catal. B: Enzym. — 2011. — Vol. 70. — P. 127–137.
183. Fuciños P., Atanes E., López-López O., Solaroli M., Cerdán M. E., González-Siso M.I. Cloning, expression, purification and characterization of an oligomeric His-tagged thermophilic esterase from *Thermus thermophilus* HB27 // Process Biochem. — 2014. — Vol. 49. — P. 927–935.
184. Fuerst J. A., Sagulenko E. Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function // Nat. Rev. Microbiol. — 2011. — Vol. 9. — P. 403–413.
185. Fukunaga Y., Kurahashi M., Sakiyama Y., Ohuchi M., Yokota A., Harayama S. *Phycisphaera mikurensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a marine alga, and proposal of *Phycisphaeraceae* fam. nov., *Phycisphaerales* ord. nov., and *Phycisphaerae* classis nov. in the phylum *Planctomycetes* // J. Gen. Appl. Microbiol. — 2009. — Vol. 55. — P. 267-275.
186. Gavrilov S.N., Lloyd J.R., Kostrikina N.A., Slobodkin A.I. Physiologic mechanisms for dissimilatory reduction of poorly crystalline Fe(III) oxide by a thermophilic gram-positive bacterium *Carboxydotherrmus ferrireducens* // Geomicrobiol. J. — 2012. — Vol. 29. — P. 804 – 819.
187. Gayon U., Dupetit G. Recherches sur la reduction des nitrates par les infiniment petits // Mem. Sot. Sci. Phys. Nat. Bordeaux — 1886. — Ser 3. — P. 201–307. (Цитируется по Payne W.J. 1986: Centenary of the Isolation of Denitrifying Bacteria // Features. — 1986. — Vol. 52, № 12. — P. 627-629.)
188. Gehrke T., Telegd, J., Thierry D., Sand W. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching // Appl. Environ. Microbiol. — 1998. — Vol. 64. — P. 2743–2747.
189. Chivian D., Brodie E.L., Alm E.J., Culley D.E., Dehal P.S., DeSantis T.Z., Gihring T.M., Lapidus A., Lin L.H., Lowry S.R., Moser D.P., Richardson P.M., Southam G., Wanger G., Pratt L.M., Andersen G.L., Hazen T.C., Brockman F.J., Arkin A.P., Onstott T.C. Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within Earth // Science. — 2008. — Vol. 322. — P. 275-278.
190. Ghosh W., Dam B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea // FEMS Microbiol. Rev. — 2009. — Vol. 33. — P. 999–1043.
191. Giggenbach W. Optical spectra and equilibrium distribution of polysulfide ions in aqueous solution at 20° // Inorg. Chem. — 1972. — Vol. 11. — P. 1201-1207.
192. Gimesi N. Hydrobiologiai Tanulmányok (Hydrobiologische Studien). I: *Planctomyces bekefii* Gim. nov. gen. et sp. [in Hungarian, with German translation]. // Budapest, Hungary: Kiadja a Magyar Ciszterci Rend. — 1924. — Vol. 1. — P.8.
193. Giovannoni S. J., Schabtach E., Castenholz R. W. *Isosphaera pallida*, gen. and comb. nov., a gliding, budding eubacterium from hot springs // Arch. Microbiol. — 1987. — Vol. 147. — P. 276–284.
194. Godfroy A., Lesongeur F., Raguenes G., Querellou J., Antoine E., Meunier J.R., GraafGuezennec J., Barbier G. *Thermococcus hydrothermalis* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1997. — Vol. 47. — P. 622–626.

195. Gorlenko V., Tsapin A., Namsaraev Z., Teal T., Tourova T., Engler D., Mielke R., Neelson K. *Anaerobranca californiensis* sp. nov., an anaerobic, alkalithermophilic, fermentative bacterium isolated from a hot spring on Mono Lake // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2004. — Vol. 54. — P. 739-743.
196. Gordon R.E., Smith N.R. Aerobic sporeforming bacteria capable of growth at high temperatures // *J. Bacteriol.* — 1949. — Vol. 58. — P. 327.
197. Gold T. The deep, hot biosphere // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1992. — Vol. 89. — P. 6045-6049.
198. Goto K., Komatsu T., Furukawa T. (1962). Rapid colorimetric determination of manganese in waters containing iron: a modification of the formaldoxime method // *Anal. Chim. Acta* — 1962. — Vol. 27. — P. 331–334.
199. Götz D., Banta A., Beveridge T J., Rushdi A.I., Simoneit B.R T., Reysenbach A.L. *Persephonella marina* gen. nov., sp. nov. and *Persephonella guaymasensis* sp. nov., two novel thermophilic hydrogen-oxidizing microaerophiles from deep-sea hydrothermal vents // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2002. — Vol. 52. — P. 1349-1359.
200. Grassia G.S., McLean K.M., Glenat P., Bauld J., Sheehy A.J. A systematic survey for thermophilic fermentative bacteria and archaea in high temperature petroleum reservoirs. // *FEMS Microbiol. Ecol.* — 1996. — Vol. 21. — P. 47–58.
201. Gray C.J., Engel A.S. Microbial diversity and impact on carbonate geochemistry across a changing geochemical gradient in a karst aquifer. // *ISME J.* — 2013. — Vol. 7. — P. 325-337.
202. Greene A.C., Patel B.K.C., Sheehy A.J. *Deferribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic manganese- and iron-reducing bacterium isolated from a petroleum reservoir // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 1997. — Vol. 47. — P. 505-509.
203. Grein F., Ramos A.R., Venceslau S.A., Pereira I.A.C. Unifying concepts in anaerobic respiration: Insights from dissimilatory sulfur metabolism // *Biochimica et Biophysica Acta.* — 2013. — Vol. 1827. — P. 145–160.
204. Groshe A., Sekaran H., Pérez- Rodríguez I., Starovoytov V., Vetriani C. *Cetia pacifica* gen. nov., sp. nov., a chemolithoautotrophic, thermophilic, nitrate-ammonifying bacterium from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2015. — Vol. 65. — P. 1144-1150.
205. Hafenbradl D., Keler M., Dirmeier R., Rachel R., Roßnagel P., Burggraf S., Huber H., Stetter K.O. *Ferroglobus placidus* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeum that oxidizes Fe²⁺ at neutral pH under anoxic conditions // *Arch. Microbiol.* — 1996. — Vol. 166. — P. 308-314.
206. Haki G.D., Rakshit S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review // *Bioresource Technology.* — 2003. — Vol. 89. — P. 17–34.
207. Hall T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 NT // *Nucleic Acids Symp.* — 1999. — Ser 41. — P. 95–98.
208. Hammer B.W. Bacteriological studies on the coagulation of evaporated milk // *Iowa Agr. Expt. Sta. Res. Bul.* — 1915. — Vol. 19.
209. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms // *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* — 2004. — Vol. 68. — P. 669–685.
210. Hanke A., Strous M. Climate, fertilization, and the nitrogen cycle // *J. Cosmology* — 2010. — Vol. 8. — P. 1838–1845.
211. Hanson T.E., Campbell B.J., Kalis K.M., Campbell M.A., Klotz M.G. Nitrate ammonification by *Nautilia profundicola* AmH: experimental evidence consistent with a free hydroxylamine intermediate // *Front. Microbiol.* — 2013. — doi:10.3389/fmicb.2013.00180

212. Harder E. C. Iron-depositing bacteria and their geologic relations. U.S. Geological Survey professional paper. — 1919. — № 113. Government Printing Office, Washington, D.C.
213. Hasan S.M., Hall J.B. The physiological function of nitrate reduction in *Clostridium perfringens* // J. Gen. Microbiol. — 1975. — Vol. 87. — P. 120-128.
214. Hedderich R., Klimmek O., Kröger A., Dirmeier R., Keller M., Stetter K.O. Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides // FEMS Microbiol. Rev. — 1999. — Vol. 22. — P. 353-381.
215. Heidelberg J.F., Paulsen I.T., Nelson K.E., Gaidos E.J., Nelson W.C., Read T.D., Eisen J.A., Seshadri R., Ward N., Methe B., Clayton R.A., Meyer T., Tsapin A., Scott J., Beanan M., Brinkac L., Daugherty S., DeBoy R.T., Dodson R.J., Durkin A.S., Haft D.H., Kolonay J.F., Madupu R., Peterson J.D., Umayam L.A., White O., Wolf A.M., Vamathevan J., Weidman J., Impraim M., Lee K., Berry K., Lee C., Mueller J., Khouri H., Gill J., Utterback T.R., McDonald L.A., Feldblyum T.V., Smith H.O., Venter J.C., Neilson K.H., Fraser C.M. Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis* // Nat. Biotechnol. — 2002. — Vol. 20. — P. 1118-1123.
216. Hendriks J., Oubrie A., Castresana J., Urbani A., Gemeinhardt S., Saraste M. Nitric oxide reductases in bacteria // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics — 2000. — Vol. 1459. — P. 266-273.
217. Hensel R., Matussek K., Michalke K., Tacke L., Tindall B.J., Kohlhoff M., Siebers B., Dielenschneider J. *Sulfophobococcus zilligii* gen. nov., spec. nov. a novel hyperthermophilic archaeum isolated from hot alkaline springs of Iceland // Syst. Appl. Microbiol. — 1997. — Vol. 20. — P. 102-110.
218. Hernandez M.E., Newman D.K. Extracellular electron transfer // Cell Mol. Life Sci. — 2001. — Vol. 58. — P. 1562-1571.
219. Higashi Y., Sunamura M., Kitamura K., Nakamura K., Kurusu Y., Ishibashi J., Urabe T., Maruyama A. Microbial diversity in hydrothermal surface to subsurface environments of Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, using a catheter-type in situ growth chamber // FEMS Microbiol. Ecol. — 2004. — Vol. 47. — P. 327-336.
220. Hirsch P., Müller M. (1985) *Planctomyces limnophilus* sp. nov., a stalked and budding bacterium from freshwater // System. Appl. Microbiol. — 1985. — Vol. 6. — P. 276-280.
221. Huang C.J., Barrett E.L. Identification and cloning of genes involved in anaerobic sulfite reduction by *Salmonella typhimurium* // J. Bacteriol. — 1990. — Vol. 172. — P. 4100-4102.
222. Huber H., Jannasch H., Rachel R., Fuchs T., Stetter K.O. *Archaeoglobus veneficus* sp. nov., a novel facultative chemolithoautotrophic hyperthermophilic sulfite reducer, isolated from abyssal black smokers // Syst. Appl. Microbiol. — 1997. — Vol. 20. — P. 374-380.
223. Huber H., Stetter K.O. (2001) *Sulfolobales*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M. eds. — Springer, New York. — Vol. 1. — pp. 198.
224. Huber H., Hohn M. , Rachel R., Fuchs T., Wimmer V. C., Stetter, K.O. A new phylum of *Archaea* represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont // Nature. — 2002a. — Vol. 417. — P. — 63-67.
225. Huber H., Diller S., Horn C., Rachel R. *Thermovibrio ruber* gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic, chemolithoautotrophic, nitrate-reducing bacterium that forms a deep branch within the phylum *Aquificae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2002b. — Vol. 52. — P. 1859-1865.

226. Huber J.A., Welch D.B.M., Morrison H.G., Huse S.M., Neal P.R., Butterfield D.A., Sogin M.L. Microbial population structures in the deep marine biosphere // *Science*. — 2007. — Vol. 318. — P. 97.
227. Huber R., Kristjansson J. K., Stetter K. O. *Pyrobaculum* gen. nov., a new genus of neutrophilic, rod-shaped archaeobacteria from continental solfataras growing optimally at 100°C // *Arch. Microbiol.* — 1987. — Vol. 149. — P. 95–101.
228. Huber R., Wilharm T., Huber D., Tricone A., Burggraf S., König H., Rachel R., Rockinger I., Fricke H., Stetter K.O. *Aquifex pyrophilus* gen. nov., sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria // *Syst. Appl. Microbiol.* — 1992. — Vol. 15. — P. 340–351.
229. Huber R., Burggraf S., Mayer T., Barns S.M., Rossnagel P., Stetter, K.O. Isolation of a hyperthermophilic archaeum predicted by *in situ* RNA analysis // *Nature*. — 1995. — Vol. 376. — P. 57–58.
230. Huber R., Rossnagel P., Woese C.R., Rachel R., Langworthy T.A., Stetter K.O. Formation of ammonium from nitrate during chemolithoautotrophic growth of the extremely thermophilic bacterium *Ammonifex degensii* gen. nov. sp. nov. // *Syst. Appl. Microbiol.* — 1996. — Vol. 19. — P. 40–49.
231. Huber R., Dyba D., Huber H., Burggraf S., Rachel R. Sulfur-inhibited *Thermosphaera aggregans* sp. nov., a new genus of hyperthermophilic archaea isolated after its prediction from environmentally derived 16S rRNA sequences // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 1998. — Vol. 48. — P. 31–38.
232. Hugenholtz P., Pitulle C., Hershberger K.L., Pace N.R. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring // *J. Bacteriol.* — 1998. — Vol. 180. — P. 366–376.
233. Hussong R.V., Hammer B.W. A thermophile coagulating milk under practical conditions // *Bacteriol.* — 1928. — Vol. — 15. — P. 179–188.
234. Hungate R.E. Studies on cellulose fermentation. I. The culture and physiology of an anaerobic cellulose-digesting bacterium // *J. Bacteriol.* — 1944. — Vol. 48. — P. 499–513.
235. Hungate R.E. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria // *Bacteriol. Revs.* — 1950. — Vol. 14. — P. 1–49.
236. Hungate R.E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes // *Methods Microbiol.* — 1969. — 3B. — P. 117–132.
237. Iino T., Nakagawa T., Mori K., Harayama S., Suzuki K. *Calditerrivibrio nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, nitrate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Japan // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2008. — Vol. 58. — P. 1675–1679.
238. Itoh T., Suzuki K., Nakase T. *Thermocladium modestius* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped, extremely thermophilic crenarchaeote // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 1998. — Vol. 48. — P. 879–887.
239. 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 // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 1999. — Vol. 49. — P. 1157–1163.
240. Itoh T., Suzuki K., Sanchez P.C., Nakase T. *Caldisphaera lagunensis* gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic crenarchaeote isolated from a hot spring at Mt. Maquiling, Philippines // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2003. — Vol. 53. — P. 1149–1154.
241. Jannasch H. W., Wirsén C.O. Chemosynthetic primary production at East Pacific sea floor spreading centers // *BioScience* — 1979. — Vol. 29. — P. 592–598.
242. Jannasch H.W., Mottl M.J. Geomicrobiology of deep hydrothermal vents // *Science*. — 1985. — Vol. 229. — P. 717–725.

243. Jeanthon C., L'Haridon S., Cuffe V., Banta A., Reysenbach A.L., Prieur D. *Thermodesulfobacterium hydrogenophilum* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2002. — Vol. 52. — P. 765–772.
244. Jetten M.S.M. The microbial nitrogen cycle // Environ. Microbiol. — 2008. — Vol. 10. — P. 2903–2909.
245. Jiang B., Henstra A.M., Paulo P.L., Balk M., van Doesburg W., Stams A.J.M. A typical one-carbon metabolism of an acetogenic and hydrogenogenic *Moorella thermoacetica* strain // Arch. Microbiol. — 2009. — Vol. 191. — P. 123-131.
246. Jiang C.Y., Liu Y., Liu Y.Y., You X.Y., Guo X., Liu S.J. *Alicyclobacillus ferrooxydans* sp. nov., a ferrous-oxidizing bacterium from solfataric soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2008. — Vol. 58. — P. 2898-2903.
247. Jiang X.C., Hu J., Fitzgerald L.A., Biffinger J.C., Xie P., Ringeisen B.R., Lieber C.M. Probing electron transfer mechanisms in *Shewanella oneidensis* Mr-1 using a nanoelectrode platform and single-cell imaging. // Proc. Natl Acad. Sci. USA. — 2010. — Vol. 107. — P. 16 806–16 810.
248. Karl D.M., Wirsén C.O., Jannasch H.W. Deep-sea primary production at the Galapagos hydrothermal vents // Science — 1980. — Vol. 207. — P. 1345-1347.
249. Karl D.M. The microbiology of deep-sea hydrothermal vents. Boca Raton: CRC Press. — 1995.
250. Kashefi K., Holmes D.E., Reysenbach A.-L., Lovley D. R. Use of Fe(III) as an electron acceptor to recover previously uncultured hyperthermophiles: isolation and characterization of *Geothermobacterium ferrireducens* gen. nov., sp. nov. // Appl. Environ. Microbiol. — 2002a. — Vol. 68. — P. 1735-1742.
251. Kashefi K., Tor J.M., Holmes D.E., Gaw Van Praagh C.V., Reysenbach A.L., Lovley D.R. *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyper- thermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2002b. — Vol. 52. — P.719–728.
252. Kashefi K., Lovley D. R. Extending the upper temperature limit for life // Science. — 2003. — Vol. 301. — P. 934.
253. Kashefi K., Holmes D.E., Baross J.A., Lovley D.R. Thermophily in the *Geobacteraceae*: *Geothermobacter ehrlichii* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic member of the *Geobacteraceae* from the 'Bag City' hydrothermal vent // Appl. Environ. Microbiol. — 2003. — Vol. 69. — P. 2985-2993.
254. Kato S., Takano Y., Kakegawa T., Oba H., Inoue K., Kobayashi C., Utsumi M., Marumo K., Kobayashi K., Ito Y., Ishibashi J., Yamagishi A. Biogeography and biodiversity in sulfide structures of active and inactive vents at deep-sea hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough // Appl. Environ. Microbiol. — 2010. — Vol. 76. — P. 2968-2979.
255. Kawaichi S., Ito N., Kamikawa R., Sugawara T., Yoshida T., Sako Y. *Ardenticatena maritima* gen. nov., sp. nov., a ferric iron- and nitrate-reducing bacterium of the phylum 'Chloroflexi' isolated from an iron-rich coastal hydrothermal field, and description of *Ardenticatena* classis nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2013. — Vol. 63. — P. 2992–3002.
256. Keller M., Braun F.J., Dirmeier R., Hafenbradl D., Burggraf S., Stetter K.O. *Thermococcus alcaliphilus* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeum growing on polysulfide at alkaline pH // Arch. Microbiol. — 1995. — Vol. 164. — P. 390-395.
257. Keller M., Dirmeier R. (2001). Hydrogen-sulfur oxidoreductase complex from *Pyrodictium abyssi* // Methods Enzymol. — 2001. — Vol. 331. — P. 442–451.

258. Kempner E. Upper temperature limit of life // *Science*. — 1963. — Vol. 142. — P. 1318-1319.
259. Kern M., Simon J. Electron transport chains and bioenergetics of respiratory nitrogen metabolism in *Wolinella succinogenes* and other *Epsilonproteobacteria* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. — 2009. — Vol. 1787. — P. 646–656.
260. Kern M., Klotz M. G., Simon J. The *Wolinella succinogenes* mcc gene cluster encodes an unconventional respiratory sulfite reduction system // *Molecular Microbiology*. — 2011. — Vol. 82. — P. 1515–1530.
261. Kern M., Volz J., Simon J. The oxidative and nitrosative stress defence network of *Wolinella succinogenes*: cytochrome c nitrite reductase mediates the stress response to nitrite, nitric oxide, hydroxylamine and hydrogen peroxide // *Environ. Microbiol.* — 2011. — Vol. 13. — P. 2478–2494.
262. Kevbrin V., Boltyanskaya Y., Garnova E., Wiegel J. *Anaerobranca zavarzinii* sp. nov., an anaerobic, alkalithermophilic bacterium isolated from Kamchatka thermal fields // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2008. — Vol. 58. — P. 1486-1491.
263. Khelifi N., Ben Romdhane E., Hedi A., Postec A., Fardeau M.-L., Hamdi M., Tholozan J.L., Ollivier B., Hirschler-Rea A. Characterization of *Microaerobacter geothermalis* gen. nov., sp. nov., a novel microaerophilic, nitrate- and nitrite-reducing thermophilic bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Tunisia // *Extremophiles*. — 2010. — Vol. 14. — P. 297304.
264. Kieft T.L., Fredrickson J. K., Onstott T.C., Gorby Y.A., Kostandarithes H.M., Bailey T.J., Kennedy D.W., Li S.W., Plymale A.E., Spadoni C.M., Gray M.S. Dissimilatory reduction of Fe(III) and other electron acceptors by a *Thermus* isolate // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1999. — Vol. 65. — P. 1214-1221.
265. 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 // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2012. — Vol. 62. — P. 716–721.
266. Kimura H., Sugihara M., Kato K., Hanada S. Selective phylogenetic analysis targeted at 16S rRNA genes of thermophiles and hyperthermophiles in deep-subsurface geothermal environments // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2006. — Vol. 72. — P. 21–27.
267. Kimura H., Ishibashi J.-I., Masuda H., Kato K., Hanada S. Selective phylogenetic analysis targeting 16S rRNA genes of hyperthermophilic archaea in the deep-subsurface hot biosphere // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2007. — Vol. 73. — P. 2110–2117.
268. Kindler A. Bemerkungen über die Bildung einiger Eisenerze // *Ann. Physik.* — 1836. — Vol. 37. — P. 203-206.
269. Kircher M., Kelso J. High-throughput DNA sequencing — concepts and limitations // *Bioessays*. — 2010. — Vol. 32. — P. 524–536.
270. Klatt C.G., Wood J.M., Rusch D.B., Bateson M.M., Hamamura N., Heidelberg J.F., Grossman A.R., Bhaya D., Cohan F.M., Köhl M., Bryant D.A., Ward D.M. Community ecology of hot spring cyanobacterial mats: predominant populations and their functional potential // *The ISME Journal* — 2011. — Vol. 5. — P. 1262–1278.
271. Kletzin A., Urich T., Müller F., Bandejas T.M., Gomes C.M. Dissimilatory oxidation and reduction of elemental sulfur in thermophilic archaea // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 2004. — Vol. 36. — P. 77–91.
272. Könneke M., Bernhard A.E., de la Torre J.R., Walker C.B., Waterbury J.B., Stahl D. A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon // *Nature*. — 2005. — Vol. 437. — P. 543–546.
273. Koonin E.V., Martin W. On the origin of genomes and cells within inorganic compartments // *Trends. Genet.* — 2005. — Vol. 21. — P. 647–654.
274. Kotelnikova S.V., Obraztsova A.Y., Gongadze G.M., Laurinavichius K.S. *Methanobacterium thermoflexum* sp. nov. and *Methanobacterium defluvii* sp. nov.,

- thermophilic rodshaped methanogens isolated from anaerobic digester sludge // *Syst. Appl. Microbiol.* — 1993. — Vol. 16. — P. 427-435.
275. Kotlar H.K., Lewin A., Johansen J., Throne-Holst M., Haverkamp T., Markussen S., Winnberg A., Ringrose P., Aakvik T., Ryeng E., Jakobsen K., Drabløs F., Valla S. High coverage sequencing of DNA from microorganisms living in an oil reservoir 2.5 kilometres subsurface // *Environ. Microbiol. Rep.* — 2011. — Vol. 3. — P. 674–681.
276. Kraft B., Strous M., Tegetmeyer H.E. Microbial nitrate respiration – genes, enzymes and environmental distribution // *J. Biotechnol.* — 2011. — Vol. 155. — P. 104–117.
277. Krämer M., Cypionka H. Sulfate formation via ATP sulfurylase in thiosulfate- and sulfite-disproportionating bacteria // *Arch. Microbiol.* — 1989. — Vol. 151. — P. 232–237.
278. Kremer D.R., Veenhuis M., Fauque G., Peck H.D. Jr., LeGall J., Lampreia J., Moura J.J., Hansen T.A. Immunocytochemical localization of APS reductase and bisulfite reductase in three *Desulfovibrio* species // *Arch. Microbiol.* — 1988. — Vol. 150. — P. 296–301.
279. Kublanov I.V., Prokofeva M.I., Kostrikina N.A., Kolganova T.V., Tourova T.P., Wiegel J., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Thermoanaerobacterium aciditolerans* sp. nov., a moderate thermoacidophile from a Kamchatka hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2007. — Vol. 57. — P. 260-264.
280. Kulichevskaya I.S., Ivanova A.O., Belova S.E., Baulina O.I., Bodelier P.L.E., Rijpstra, W.I.C., Damste' J.S.S., Zavarzin G.A., Dedysh S.N. *Schlesneria paludicola* gen. nov., sp. nov., the first acidophilic member of the order *Planctomycetales*, from Sphagnum-dominated boreal wetlands // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2007. — Vol. 57. — P. 2680-2687.
281. Kurr M., Huber R., Knig H., Jannasch H.W., Fricke H., Trincone A., Kristjansson J.K., Stetter, K.O. *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C // *Arch. Microbiol.* — 1991. — Vol. 156. — P. 239–247.
282. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* / Eds. Stackebrandt E. and Goodfellow M. New York: Wiley. — 1991. — P. 115–175.
283. Feinberg L.F., Srikanth R., Vachet R.W., Holden J.F. Constraints on anaerobic respiration in the hyperthermophilic archaea *Pyrobaculum islandicum* and *Pyrobaculum aerophilum* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2008. — Vol. 74. — P. 396–402.
284. Leang C., Coppi M.V., Lovley D.R. OmcB, a c-type polyheme cytochrome, involved in Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens* // *J. Bacteriol.* — 2003. — Vol. 185. — P. 2096-2103.
285. Lee Y.E., Jain M.K., Lee C., Lowe S.E., Zeikus J.G. Taxonomic distinction of saccharolytic anaerobes: description of *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* gen. nov., sp. nov., and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* gen. nov., sp. nov.; reclassification of *Thermoanaerobium brockii*, *Clostridium thermosulfurogenes*, and *Clostridium thermohydrosulfuricum* as *Thermoanaerobacter brockii* comb. nov., *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* comb. nov., and *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* comb. nov., respectively; and transfer of *Clostridium thermohydrosulfuricum* to *Thermoanaerobacter ethanolicus* // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 1993. — Vol. 43. — P. 41–51.
286. Lehmann S., Johnston A.W.B., Curson A.R.J., Todd J.D., Cook A.M. SoeABC, a novel sulfite dehydrogenase in the *Roseobacters?* / In Programme & Abstract Book EMBO Workshop on Microbial Sulfur Metabolism, Noordwijkerhout — 2012. — P. 29.
287. Lewin A., Wentzel A., Valla S. Metagenomics of microbial life in extreme temperature environments // *Cur. Op. Biotechnol.* — 2013. — Vol. 24. — P. 516–525.

288. L'Haridon, S., Cilia V., Messner P., Raguénès G., Gambacorta A., Sleytr U.B., Prieur D., Jeanthon C. *Desulfurobacterium thermolithotrophum* gen. nov., sp. nov., a novel autotrophic, sulphur-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1998. — Vol. 48. — P. 701-711.
289. L'Haridon S., Miroshnichenko M.L., Kostrikina N.A., Tindall B.J., Spring S., Schumann P., Stackebrandt E., Bonch-Osmolovskaya E.A., Jeanthon C. *Vulcanibacillus modesticaldus* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, nitrate-reducing bacterium from deep-sea hydrothermal vents // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2006a. — Vol. 56. — P.1047-1053.
290. L'Haridon S., Reysenbach A.L., Tindall B.J., Schönheit P., Banta A., Johnsen U., Schumann P., Gambacorta A., Stackebrandt E., Jeanthon C. *Desulfurobacterium atlanticum* sp. nov., *Desulfurobacterium pacificum* sp. nov. and *Thermovibrio guaymasensis* sp. nov., three thermophilic members of the *Desulfurobacteriaceae* fam. nov., a deep branching lineage within the *Bacteria* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2006b. — Vol. 56. — P. 2843-2852.
291. Li D., Greenfield P., Rosewarne C.P., Midgley D.J. Draft genome sequence of *Thermoanaerobacter* sp. strain A7A, reconstructed from a metagenome obtained from a high-temperature hydrocarbon reservoir in the Bass Strait, Australia // Genome Announc. — 2013. — 1(5):e00701-13.
292. Li H., Yang S.-Z., Mu B.-Z., Rong Z.-F., Zhang J. (2006) Molecular analysis of the bacterial community in a continental high temperature and water-flooded petroleum reservoir // FEMS Microbiol. Lett. — 2006. — Vol. 257. — P. 92–98.
293. Li H., Yang Q., Li J., Gao H., Li P., Zhou H. The impact of temperature on microbial diversity and AOA activity in the Tengchong Geothermal Field, China // Scientific Reports. — 2015. — Vol. 5. — P. 17056 | DOI: 10.1038/srep17056.
294. Li S., Zhong H., Hu Y., Zhao J., He Z., Gu G. Bioleaching of a low-grade nickel-copper sulfide by mixture of four thermophiles // Bioresour. Technol. — 2014. — Vol.153. — P. 300–306.
295. Li Y., Mandelco L., Wiegel J. Isolation and characterization of a moderately thermophilic anaerobic alkaliphile, *Clostridium paradoxum* sp. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1993. — Vol. 43. — P. 450–460.
296. Li Y., Engle M., Weiss N., Mandelco L., Wiegel J. *Clostridium thermoalkaliphilum* sp. nov., an anaerobic and thermotolerant facultative alkaliphile // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1994. — Vol. 44. — P. 111–118.
297. Lies D.P., Hernandez M.E., Kappler A., Mielke R.E., Gralnick J.A., Newman D.K. *Shewanella oneidensis* Mr-1 uses overlapping pathways for iron reduction at a distance and by direct contact under conditions relevant for biofilms // Appl. Environ. Microbiol. — 2005. — Vol. 71. — P. 4414–4426.
298. Liu Y., Beer L.L., Whitman W.B. Sulfur metabolism in archaea reveals novel processes // Environ. Microbiol. — 2012a. — Vol. 14. — P. 2632-2644.
299. Liu D., Liu Y., Men X., Guo Q., Guo R., Qiu Y. Isolation and characterization of *Thermopirellula anaerolimosa* gen. nov., sp. nov., an obligate anaerobic hydrogen-producing bacterium of the phylum *Planctomycetes* // *Wei Sheng Wu Xue Bao* — 2012b. — Vol. 52. — P. 994-1001. [На китайском, доступен только перевод абстракта на английский].
300. Liu S.Y., Rainey F.A., Morgan H.W., Mayer F., Wiegel J. *Thermoanaerobacterium aotearoense* sp. nov., a slightly acidophilic, anaerobic thermophile isolated from various hot springs in New Zealand, and emendation of the genus *Thermoanaerobacterium* // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1996. — Vol. 46. — P. 388-396.
301. Lippmann J., Stute M., Torgersen T., Moser D.P., Hall J., Lin L., Borcsic M., Belamy R., Onstott T.C. Dating ultra-deep mine waters with noble gases and ³⁶Cl,

- Witwatersrand Basin, South Africa // *Geochim. Cosmochim. Acta.* — 2003. — Vol. 67. — P. 4597-4619.
302. Ljungdahl L.G., Wiegel J. Working with anaerobic bacteria. / In A.L. Demain and N.A. Solomon (ed.), *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. — 1986. — P. 84-96.
303. López-López O., Cerdán M.E., González-Siso M.I. Hot spring metagenomics // *Life*. — 2013. — Vol. 2. — p. 308-320.
304. Lovley D.R., Stolz J.F., Nord G.L., Phillips E.J.P. Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism // *Nature*. — 1987. — Vol. 330. — P. 252–254.
305. Lovley D.R. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction // *Microbiol. Rev.* — 1991. — Vol. 55.
306. Lovley D.R., Coates J.D., Blunt-Harris E.L., Phillips E.J.P., Woodward J.C. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration // *Nature*. — 1996. — Vol. 382. — P. 445–448.
307. Lovley D.R., Phillips E.J.P. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1998. — Vol. 54. — P.1472-1480.
308. Lovley D.R., Holmes D.E., Nevin K.P. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction // *Adv. Microb. Physiol.* — 2004. — Vol. 49. — P. 219-286.
309. Lovley D.R., Malvankar N.S. Seeing is believing: novel imaging techniques help clarify microbial nanowire structure and function // *Environ. Microbiol.* — 2015. — Vol. 17 — P. 2209–2215/
310. Lu W.-P., Swoboda E.P., Kelly D.P. Properties of the thiosulfateoxidizing multi-enzyme system from *Thiobacillus versutus* // *Biochim. Biophys. Acta* — 1985. — Vol. 828. — P. 116–122.
311. Lundberg K.S., Shoemaker D.D., Adams M.W., Short J.M., Sorge J.A., Mathur E.J. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus* // *Gene*. — 1991. — Vol. 108. — P. 1–6.
312. Lyons T.W., Reinhard C.T., Planavsky N.J. The rise of oxygen in earth's early ocean and atmosphere // *Nature*. — 2014. — Vol. 506. — P. 307–315.
313. Magot M., Ollivier B., Patel B.K.C. Microbiology of petroleum reservoirs // *Antonie van Leeuwenhoek*. — 2000. — Vol. 77. — P. 103–116.
314. Mancinelli R.L., McKay C. The evolution of the nitrogen cycle // *Orig. Life Evol.* — 1988. — B 18. — P. 311–325.
315. Manzella M.P., Reguera G., Kashefi K. 2013. Extracellular electron transfer to Fe(III) oxides by the hyperthermophilic archaeon *Geoglobus ahangari* via a direct contact mechanism // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2013. — Vol. 79. — P. 4694–4700.
316. Manzella M.P., Holmes D.E., Rocheleau J.M., Chung A., Reguera G., Kashefi K. The complete genome sequence and emendation of the hyperthermophilic, obligate iron-reducing archaeon “*Geoglobus ahangari*” strain 234^T // *Standards in Genomic Sciences*. — 2015. — Vol. 10. — P. 77.
317. Mardanov A.V, Slobodkina G.B., Slobodkin A.I., Beletsky A.V., Gavrilov S.N., Kublanov I.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Skryabin K.G., The *Geoglobus acetivorans* genome: Fe(III) reduction, acetate utilization, autotrophic growth, and degradation of aromatic compounds in a hyperthermophilic archaeon // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2015. — Vol. 81. — P.1003–1012.
318. Mardanov A.V, Beletsky A.V., Kadnikov V.V., Slobodkin A.I., Ravin N.V. Genome analysis of *Thermosulfurimonas dismutans*, the first thermophilic sulfur-disproportionating bacterium of the phylum *Thermodesulfobacteria* // *Front. Microbiol.* — 2016. — Vol. 7. — P. 950.

319. Mardis E.R. Next-generation, DNA sequencing methods // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* — 2008. — Vol. 9. — P. 387–402.
320. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms // *J. Mol. Biol.* — 1961. — Vol. 3. — P. 208–218.
321. Marmur J., Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature // *J. Mol. Biol.* — 1962. — Vol. 4. — P. 109–118.
322. Marshall C., May H. Electrochemical evidence of direct electrode reduction by a thermophilic Gram-positive bacterium, *Thermincola ferriacetica* // *Energy Environ. Sci.* — 2009. — Vol. 2. — P. 699–705.
323. Martin W., Russell M. J. On the origin of biochemistry at an alkaline hydrothermal vent // *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* — 2007. — B 362. — P. 1887–1925.
324. Martin W.F., Garg S., Zimorski V. 2015. Endosymbiotic theories for eukaryote origin // *Phil. Trans. R. Soc. B.* — 2015. — 370: 20140330.
325. Martin W.F., Sousa F.L. Early microbial evolution: the age of anaerobes // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* — 2016. — 8:a018127.
326. Martinez-Espinosa R.M., Bridge E.J., Bonete M.J., Butt J.N., Butler C.S., Sargent F., Richardson D.J. Look on the positive side! The orientation, identification and bioenergetics of “archaeal” membrane-bound nitrate reductases // *FEMS Microbiol. Lett.* — 2007. — Vol. 276. — P. 129–139.
327. Mattila P., Korpela J., Tenkanen T., Pitkänen K. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase - an extremely heat stable enzyme with proofreading activity // *Nucleic Acids Res.* — 1991. — Vol. 19. — P. 4967–4973.
328. McClung L.S. Studies on anaerobic bacteria. IV. Taxonomy of cultures of thermophilic species causing "swells" of canned foods // *J. Bacteriol.* — 1935. — Vol. 29. — P. 189–203.
329. McMahan S., Parnell J. Weighing the deep continental biosphere // *FEMS Microbiol. Ecol.* — 2014. — Vol. 87. — P. —113–120.
330. Merkel A.Y., Huber J.A., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Lebedinsky A.V. Detection of putatively thermophilic anaerobic methanotrophs in diffuse hydrothermal vent fluids // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2013. — Vol. 79. — P. 915–923.
331. Mehta R., Singhal P., Singh H., Damle D., Sharm A.K. Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications // *3 Biotech.* — 2016. — Vol. 6. — P. 81. DOI 10.1007/s13205-016-0368-z
332. Mehta T., Coppi M.V., Childers S.E., Lovley D.R. Outer membrane c-type cytochromes required for Fe(III) and Mn(IV) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2005. — Vol. 71. — P. 8634–8641.
333. Methe B.A., Nelson K.E., Eisen J.A., Paulsen I.T., Nelson W., Heidelberg J.F., Wu D., Wu M., Ward N., Beanan M.J., Dodson R.J., Madupu R., Brinkac L.M., Daugherty S.C., DeBoy R.T., Durkin A.S., Gwinn M., Kolonay J.F., Sullivan S.A., Haft D.H., Selengut J., Davidsen T.M., Zafar N., White O., Tran B., Romero C., Forberger H.A., Weidman J., Khouri H., Feldblyum T.V., Utterback T.R., Van Aken S.E., Lovley D.R., Fraser C.M. Genome of *Geobacter sulfurreducens* metal reduction in subsurface environments // *Science.* — 2003. — Vol. 302. — P. 1967–1969.
334. Mesbah N.M., Hedrick D.B., Peacock A.D., Rohde M., Wiegel J. *Natranaerobius thermophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic, alkalithermophilic bacterium from soda lakes of the Wadi An Natrun, Egypt, and proposal of *Natranaerobiaceae* fam. nov. and *Natranaerobiales* ord. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2007. — Vol. 57. — P. 2507–2512.

335. Meyer T.E., Cusanovich M.A. Discovery and characterization of electron transfer proteins in the photosynthetic bacteria // *Photosyn. Res.* — 2003. — Vol. 76. — P. 111–126.
336. Miranda-Tello E., Fardeau M.-L., Sepúlveda J., Fernández L., Cayol J.-L., Thomas P., Ollivier B. *Garciella nitratreducens* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, nitrate- and thiosulfate-reducing bacterium isolated from an oilfield separator in the Gulf of Mexico // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2003. — Vol. 53. — P. 1509–1514.
337. Miroshnichenko M.L., Kostrikina N.A., L'Haridon S., Jeanthon C., Hippe H., Stackebrandt E., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Nautilia lithotrophica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfur-reducing ϵ -proteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2002. — Vol. 52. — P. 1299-1304.
338. Miroshnichenko M.L., L'Haridon S., Jeanthon C., Antipov A.N., Kostrikina N.A., Tindall B.J., Schumann P., Spring S., Stackebrandt E., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Oceanithermus profundus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, microaerophilic, facultatively chemolithoheterotrophic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2003a. — Vol. 53. — P. 747-752.
339. Miroshnichenko M.L., L'Haridon S., Nercessian O., Antipov A.N., Kostrikina N.A., Tindall B.J., Schumann P., Spring S., Stackebrandt E., Bonch-Osmolovskaya E.A., Jeanthon C. *Vulcanithermus mediatlanticus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Thermaceae* from a deep-sea hot vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2003b. — Vol. 53. — P. 1143-1148.
340. Miroshnichenko M.L., Kostrikina N.A., Chernyh N.A., Pimenov N.V., Tourova T.P., Antipov A.N., Spring S., Stackebrandt E., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Caldithrix abyssi* gen. nov., sp. nov., a nitrate-reducing, thermophilic, anaerobic bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent, represents a novel bacterial lineage // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2003c. — Vol. 53. — P. 323-329.
341. Miroshnichenko M.L., Slobodkin A.I., Kostrikina N.A., L'Haridon S., Nercessian O., Spring S., Stackebrandt E., Bonch-Osmolovskaya E.A., Jeanthon C. *Deferribacter abyssi* sp. nov., an anaerobic thermophile from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2003d. — Vol. 53. — P. 1637-1641.
342. Miroshnichenko M.L., Bonch-Osmolovskaya E.A. Recent developments in the thermophilic microbiology of deep-sea hydrothermal vents // *Extremophiles.* — 2006. — Vol. 10. — P. 85–96.
343. Moody J. B. Serpentinization; a review. // *Lithos.* — 1976. — Vol. 9. — P. 125-138.
344. 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. — Vol. 7. — P. 283–290.
345. Mori K., Kakegawa T., Higashi Y., Nakamura K., Maruyama A., Hanada S. *Oceanithermus desulfurans* sp. nov., a novel thermophilic, sulfur-reducing bacterium isolated from a sulfide chimney in Suiyo Seamount // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2004. — Vol. 54. — P. 1561-1566.
346. Mori K., Yamaguchi K., Sakiyama Y., Urabe T., Suzuki K. *Caldisericum exile* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, filamentous bacterium of a novel bacterial phylum, *Caldiserica* phyl. nov., originally called the candidate phylum OP5, and description of *Caldiseriaceae* fam. nov., *Caldisericales* ord. nov. and *Caldisericia* classis nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2009. — Vol. 59. — P. 2894 - 2898.
347. Morrison L.E., Tanner F.W. Studies on thermophilic bacteria: I. Aerobic thermophilic bacteria from water // *J. Bacteriol.* — 1922. — Vol. 7. — P. 343–366.
348. Moura I., Moura J.J.G. Structural aspects of denitrifying enzymes // *Cur. Op. Chem. Biol.* — 2001, — Vol. 5. — P. 168–175.

349. Moussard H., L'Haridon S., Tindall B.J., Banta A., Schumann P., Stackebrandt E., Reysenbach A.-L., Jeanthon C. *Thermodesulfatator indicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic chemolithoautotrophic sulfate-reducing bacterium isolated from the Central Indian Ridge // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2004. — Vol. 54. — P. 227–233.
350. Müller A.L., Kjeldsen K.U., Rattei T., Pester M., Loy A. Phylogenetic and environmental diversity of DsrAB-type dissimilatory (bi)sulfite reductases // *ISME J.* — 2015. — Vol. 9. — P. 1152–1165.
351. Muyzer G., Stams A.J.M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria // *Nature Rev. Microbiol.* — 2008. — Vol. 6. — P. 441–454.
352. 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 16S rRNA // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1993. — Vol. 59. — P. 695–700.
353. Muyzer G., Teske A., Wirsen C.O., Jannasch H.W. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments // *Arch. Microbiol.* — 1995. Vol. 164. — P. 165–172.
354. Muyzer G., Brinkhoff T., Nubel U., Santegoeds C., Schafer H., Wawer C., Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Molecular microbial ecology manual* / Kluwer academic Publishers. — 1997. — P. 1-27.
355. Myers C.R., Neelson K.H. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor // *Science.* — 1988. — Vol. 240. — P. 1319-1321.
356. Nakagawa S., Nakamura S., Inagaki F., Takai K., Shirai N., Sako Y. *Hydrogenivirga caldilitoris* gen. nov., sp. nov., a novel extremely thermophilic, hydrogen- and sulfur-oxidizing bacterium from a coastal hydrothermal field // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2004. — Vol. 54. — P. 2079-2084.
357. Nakagawa S., Takai K., Inagaki F., Horikoshi K., Sako Y. *Nitratiruptor tergarcus* gen. nov., sp. nov. and *Nitratifractor salsuginis* gen. nov., sp. nov., nitrate-reducing chemolithoautotrophs of the ϵ -Proteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal system in the Mid-Okinawa Trough // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2005. — Vol. 55. — P. 925-933.
358. Nazina T.N., Ivanova A.E., Borzenkov I.A., Belyaev S.S., Ivanov M.V. Occurrence and geochemical activity of microorganisms in high-temperature, water-flooded oil fields of Kazakhstan and Western Siberia // *Geomicrobiol. J.* — 1995. — Vol. 13. — P. 403–408.
359. Nazina T.N., Tourova T.P., Poltarau A.B., Novikova E.V., Grigoryan A.A., Ivanova A.E., Lysenko A.M., Petrunyaka V.V., Osipov G.A., Belyaev S.S., Ivanov M.V. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2001. — Vol. 51. — P. 433–446.
360. Nazina T.N., Lebedeva E.V., Poltarau A.B., Tourova T.P., Grigoryan A.A., Sokolova D.S., Lysenko A.M., Osipov G.A. *Geobacillus gargensis* sp. nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of *Bacillus vulcani* as *Geobacillus vulcani* comb. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2004. — Vol. 54. — P. 2019–2024.

361. Nealson K.H., Myers C.R. Iron reduction by bacteria: a potential role in the genesis of banded iron formations. // *American J. Sci.* — 1990. — Vol. 290-A. — P. 35-45.
362. Nealson K.H., Saffarini D. (1994). Iron and manganese in anaerobic respiration: environmental significance, physiology, and regulation // *Annu. Rev. Microbiol.* — 1994. — Vol. 48. — P. 311-343.
363. Nepomnyashchaya Y.N., Slobodkina G.B., Baslerov R.V., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Netrusov A.I., Slobodkin A.I. *Moorella humiferrea* sp. nov., a thermophilic, anaerobic bacterium capable of growth via electron shuttling between humic acid and Fe(III) // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2012. — Vol. 62. — P. 613-617.
364. Nesbø C.L., Bradnan D.M., Adebisuyi A., Dlutek M., Petrus A.K., Foght J., Doolittle W.F., Noll K.M. *Mesotoga prima* gen. nov., sp. nov., the first described mesophilic species of the *Thermotogales* // *Extremophiles.* — 2012. — Vol. 16. — P. 387-393.
365. Neujahr H.I., Calcieri D.A. On vitamins in sewage sludge. Production on vitamin B₁₂ by an enrichment culture of *Methanobacterium omelianskii* // *Acta Chem. Scand.* — 1958. — Vol. 12. — P. 1153.
366. Neujahr H.I. On vitamins in sewage sludge. Further studies on the production on vitamin B₁₂ by some enrichment cultures of methane bacteria // *Acta Chem. Scand.* — 1960. — Vol. 14. — P. 28.
367. Nevin K.P., Lovley D.R. 2002 Mechanisms for Fe(III) oxide reduction in sedimentary environments // *Geomicrobiol. J.* — 2002a. — Vol.19. — P. 141-159.
368. Nevin K.P., Lovley D.R. Mechanisms for accessing insoluble Fe(III) oxide during dissimilatory Fe(III) reduction by *Geothrix fermentans* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2002b. — Vol. 68. — P. 2294-2299.
369. Niederberger T.D., Götz D.K., McDonald I.R., Ronimus R.S., Morgan H.W. *Ignisphaera aggregans* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic crenarchaeote isolated from hot springs in Rotorua and Tokaanu, New Zealand // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2006. — Vol. 56. — P. 965-971.
370. Nielsen M.B., Kjeldsen K.U., Ingvorsen K. *Desulfitibacter alkalitolerans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, alkalitolerant, sulfite-reducing bacterium isolated from a district heating plant // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2006. — Vol. — 56. — P. 2831-2836.
371. Niu L., Song L., Liu X., Dong X. *Tepidimicrobium xylanilyticum* sp. nov., an anaerobic xylanolytic bacterium, and emended description of the genus *Tepidimicrobium* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2009. — Vol. 59. — P. 2698-2701.
372. Norris P.R., Clark D.A., Owen J.P., Waterhouse S. Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria // *Microbiology.* — 1996. — Vol. 142. — P. 775-783.
373. Novikov A.A., Sokolova T.G., Lebedinsky A.V., Kolganova T.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Carboxydotherrmus islandicus* sp. nov., a thermophilic, hydrogenogenic, carboxydrotrophic bacterium isolated from a hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2011. — Vol. 61. — P. 2532-2537.
374. Nunoura T., Miyazaki M., Suzuki Y., Takai K., Horikoshi K. *Hydrogenivirga okinawensis* sp. nov., a thermophilic sulfur-oxidizing chemolithoautotroph isolated from a deep-sea hydrothermal field, Southern Okinawa Trough // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2008. — Vol. 58. — P. 676-681.
375. Nunoura T., Takai K. Comparison of microbial communities associated with phase-separation-induced hydrothermal fluids at the Yonaguni Knoll IV hydrothermal field, the Southern Okinawa Trough // *FEMS Microbiol. Ecol.* — 2009. — Vol.67. — P. 351-370.
376. Offre P., Spang A., Schleper C. *Archaea* in Biogeochemical Cycles // *Annu. Rev. Microbiol.* — 2013. — Vol. 67. — P. 437-457.

377. Ogg C.D., Patel B.K.C. *Caloramator australicus* sp. nov., a thermophilic, anaerobic bacterium from the Great Artesian Basin of Australia // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2009. — Vol. 59. — P. 95-101.
378. Ogg C.D., Patel B.K.C. *Fervidicella metallireducens* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, anaerobic bacterium from geothermal waters // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2010. — Vol. 60. — P. 1394-1400.
379. Ono S., Eigenbrode J.L., Pavlov A.A., Kharecha P., Rumble III D., Kasting J.F., Freeman K.H. New insights into Archean sulfur cycle from mass-independent sulfur isotope records from the Hamersley Basin, Australia // *Earth Planet. Sci. Lett.* — 2003. — Vol. 213. — P. 15–30.
380. Op den Camp H.J.M., Kartal B., Guven D., van Niftrik L.A.M.P., Haaijer S.C.M., van der Star W.R.L., van de Pas-Schoonen K.T., Cabezas A., Ying Z., Schmid M.C., Kuypers M.M.M., van de Vossenberg J., Harhangi H.R., Picioreanu C., van Loosdrecht M.C.M., Kuenen J.G., Strous M., Jetten M.S.M. Global impact and application of the anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria // *Biochem. Soc. Trans.* — 2006. — Vol. 34. — P. 174-178.
381. Orphan V.J., Taylor L.T., Hafenbradl D., Delong E.F. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2000. — Vol. 66. — P. 700–711.
382. Oren, A. The family *Ectothiorhodospiraceae*. In *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: prokaryotic communities and ecophysiology*, 2013, 4th edn, v. 6, pp. 199-223. Edited by E. Rosenberg, E.F. DeLong, S Lory, E. Stackebrandt & F. Thompson. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
383. Parte A.C. LPSN — list of prokaryotic names with standing in nomenclature // *Nuc. Acids Res.* — 2014. — Vol. 42. — Issue D1, D613–D616. doi: 10.1093/nar/gkt1111
384. Peck H. D., Jr. The ATP-dependent reduction of sulfate with hydrogen in extracts of *Desulfovibrio desulfuricans* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* — 1959. — Vol. 45. — P. 701–708.
385. Pedersen K. Microbial life in deep granitic rock // *FEMS Microbiol. Rev.* — 1997. — Vol. 20. — P. 399-414.
386. Pedersen K., Hallbeck L., Arlinger J., Erlandson A.C., Jahromi N. Investigation of the potential for microbial contamination of deep granitic aquifers during drilling using 16S rRNA gene sequencing and culturing method // *J. Microbiol. Methods* — 1997. — Vol. 30. — P. 179-192.
387. 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 // *Front. Microbiol.* — 2011. — Vol. 2. — P. 69.
388. Perevalova A.A., Bidzhieva S.K., Kublanov I.V., Hinrichs K.U., Liu X.L., Mardanov A.V., Lebedinsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Fervidicoccus fontis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic crenarchaeote from terrestrial hot springs, and proposal of *Fervidicoccaceae* fam. nov. and *Fervidicoccales* ord. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2010. — Vol. 60. — P. 2082-2088.
389. Pérez-Rodríguez I., Ricci J., Voordeckers J.W., Starovoytov V., Vetriani C. *Nautilia nitratireducens* sp. nov., a thermophilic, anaerobic, chemosynthetic, nitrate-ammonifying bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2010. — Vol. 60. — P. 1182-1186.
390. Pérez-Rodríguez I., Grosche A., Massenbur L., Starovoytov V., Lutz R.A., Vetriani C. *Phorcysia thermohydrogeniphila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, nitrate-ammonifying bacterium from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2012. — Vol. 62. — P. 2388-2394.

391. Pfennig N. Anreicherungskulturen für Rote und Grüne Schwefelbakterium // Z. Bakteriolog. Hyg. I Abt. — 1965. — Suppl. 1 — P. 179-189.
392. Plumb J.J., Haddad C.M., Gibson J.A.E., Franzmann P.D. *Acidianus sulfdivorans* sp. nov., an extremely acidophilic, thermophilic archaeon isolated from a solfatara on Lihir Island, Papua New Guinea, and emendation of the genus description // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2007. — Vol. 57. — P. 1418–1423.
393. Podar M., Anderson I., Makarova K.S., Elkins J.G., Ivanova N., Wall M., Lykidis A., Mavrommatis K., Sun H., Hudson M.E. Chen W., Deciu C., Hutchison D., Eads J.R., Anderson A., Fernandes F., Szeto E., Lapidus A., Kyrpides N.C., Saier M.H., Jr, Richardson P.M., Rachel R., Huber H., Eisen, J.A. Koonin E.V., Keller M., Stetter K.O. A genomic analysis of the archaeal system *Ignicoccus hospitalis*: *Nanoarchaeum equitans* // Genome Biol. — 2008. — 9, R158.
394. Poddar A., Lepcha R.T., Das S.K. Taxonomic study of the genus *Tepidiphilus*: transfer of *Petrobacter succinatimandens* to the genus *Tepidiphilus* as *Tepidiphilus succinatimandens* comb. nov., emended description of the genus *Tepidiphilus* and description of *Tepidiphilus thermophilus* sp. nov., isolated from a terrestrial hot spring Int. J. Syst. // Evol. Microbiol. — 2014. — Vol. 64. — P. 228-235.
395. Podosokorskaya O.A., Kadnikov V.V., Gavrillov S.N., Mardanov A.V., Merkel A.Y., Karnachuk O.V., Ravin N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. Characterization of *Melioribacter roseus* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic thermophilic cellulolytic bacterium from the class *Ignavibacteria*, and a proposal of a novel bacterial phylum *Ignavibacteriae* // Environ. Microbiol. — 2013. — Vol. 15. — P. 1759-1771.
396. Pooock S.R., Leach E.R., Moir J.W.B., Cole J.A., Richardson D.J. Respiratory detoxification of nitric oxide by the cytochrome c nitrite reductase of *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. — 2002. — Vol. 277. — P. 23664–23669.
397. Poser A., Lohmayer R., Vogt C., Knoeller K., Planer-Friedrich B., Sorokin D., Richnow H.-H., Finster K. Disproportionation of elemental sulfur by haloalkaliphilic bacteria from soda lakes // Extremophiles. — 2013. — Vol. 17. — P. 1003-1012.
398. Postgate I.R. Sulfate reduction by bacteria // Ann. Rev. Microbiol. — 1959. — Vol.13. — P. 505/
399. Rabus R., Venceslau S.S., Wöhlbrand L., Voordouw G., Wall J.D., Pereira I.A. A post-genomic view of the ecophysiology, catabolism and biotechnological relevance of sulphate-reducing prokaryotes // Adv. Microb. Physiol. — 2015. — Vol. 66. — P. 55-321.
400. Reguera G., McCarthy K.D., Mehta T., Nicoll J.S., Tuominen M.T., Lovley D.R. Extracellular electron transfer via microbial nanowires // Nature. — 2005. — Vol. 435. — P. 1098–1101.
401. Reysenbach A.L. Phylum BII. *Thermotogae* phy. nov. / Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M. (editors): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 1 (The *Archaea* and the deeply branching and phototrophic *Bacteria*), Springer-Verlag, New York. — 2001. — P. 369-387.
402. Reysenbach A.-L., Liu Y., Banta A.B., Beveridge T.J., Kirshtein J.D., Schouten S., Tivey M.K., Von Damm K., Voytek M.A. Isolation of a ubiquitous obligate thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents // Nature. — 2006. — Vol. 442. — P. 444–447.
403. Richardson D., Felgate H., Watmough N., Thomson A., Baggs E. Mitigating release of the potent greenhouse gas N₂O from the nitrogen cycle — could enzymic regulation hold the key? // Trends Biotechnol. — 2009. — Vol. 27. — P. 388–397.
404. Richardson T.H., Tan X., Frey G., Callen W., Cabell M., Lam D., Macomber J., Short J.M., Robertson D.E., Miller C. A novel, high performance enzyme for starch

- liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable α -amylase // J. Biol. Chem. — 2002. — Vol. 277. — P. 26501-26507.
405. Richter K., Schicklberger M., Gescher J. Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration // Appl. Environ. Microbiol. — 2012. — Vol. 78. — P. 913-921.
406. Roberts J.L. Reduction of ferric hydroxide by strains of *Bacillus polymyxa* // Soil Sci. — 1947. — Vol. 63. — P. 135-140.
407. Rohwerder T., Sand W. The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. // Microbiology. — 2003. — Vol. 149. — P. 1699-1709.
408. Roy A.B., Trudinger P.A. The biochemistry of inorganic compounds of sulfur // Cambridge University Press, London. — 1970.
409. Russell M. J., Daniel R. M., Hall A. J., Sherringham J. A hydrothermally precipitated catalytic iron sulphide membrane as a first step toward life // J. Mol. Evol. — 1994. — Vol. 39. — P. 231-243.
410. Russell M. J., Hall A. J. The emergence of life from iron monosulphide bubbles at a submarine hydrothermal redox and pH front // J. Geol. Soc. Lond. — 1997. — Vol. 154. — P. 377-402.
411. 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 // Arch. Microbiol. — 2006. — Vol. 186. — P. 357-366.
412. Santos A.A, Venceslau S.S., Grein F., Leavitt W.D., Dahl C., Johnston D.T., Pereira I.A.C. A protein trisulfide couples dissimilatory sulfate reduction to energy conservation // Science. — 2015. — Vol. 350. — P. 1541-1545.
413. Sar P., Kazy S.K., Paul D., Sarkar A. Metal bioremediation by thermophilic microorganisms / Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology. Springer. — 2013. — P. 171-201.
414. Sarles W.B., Hammer B.W. Observations on *Bacillus coagulans* // J. Bacteriol. — 1932. — Vol. 23. — P. 301-314.
415. Savary V., Pagel M. The effects of water radiolysis on local redox conditions in the Oklo, Gabon, natural fission reactors 10 and 16 // Geochim. Cosmochim. Acta — 1997. — Vol. 61. — P. 4479-4494.
416. Scully S.M., Orlygsson J. Recent advances in second generation ethanol production by thermophilic bacteria // Energies. — 2015. — Vol. 8. — P. 1-30. doi:10.3390/en8010001
417. Schlesner H. *Planctomyces brasiliensis* sp. nov., a halotolerant bacterium from a salt pit // Syst. Appl. Microbiol. — 1989. — Vol. 12. — P. 159-161.
418. Schlesner H., Rensmann C., Tindall B.J., Gade D., Rabus R., Pfeiffer S., Hirsch P. Taxonomic heterogeneity within the Planctomycetales as derived by DNA-DNA hybridization, description of *Rhodopirellula baltica* gen. nov., sp. nov., transfer of *Pirellula marina* to the genus *Blastopirellula* gen. nov. as *Blastopirellula marina* comb. nov. and emended description of the genus *Pirellula* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2004. — Vol. 54. — P. 1567-1580.
419. Schumacher W., Kroneck P.M.H., Pfennig N. Comparative systematic study on “*Spirillum*” 5175, *Campylobacter* and *Wolinella* species. Description of “*Spirillum*” 5175 as *Sulfurospirillum deleyianum* gen. nov., spec. nov. // Arch. Microbiol. — 1992. — Vol. 158. — P. 287-293.
420. Schütz M., Shahak Y., Padan E., Hauska G. Sulfide-quinone reductase from *Rhodobacter capsulatus* // J. Biol. Chem. — 1997. — Vol. 272. — P. 9890-9894.

421. Seewald J.S. (2001). Aqueous geochemistry of low molecular weight hydrocarbons at elevated temperatures and pressures: Constraints from mineral buffered laboratory experiments // *Geochim. Cosmochim. Acta* — 2001. — Vol. 65. — P. 1641-1664.
422. Sekiguchi Y., Yamada T., Hanada S., Ohashi A., Harada H., Kamagata Y. *Anaerolinea thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain *Bacteria* at the subphylum level // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2003. — Vol. 53. — P. 1843-1851.
423. 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* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2008. — Vol. 58. — P. 2541–2548.
424. Sen S.K., Jana A., Bandyopadhyay P., DasMohapatra P.K., Raut S. Thermostable amylase production from hot spring isolate *Exiguobacterium* sp: a promising agent for natural detergents // *Sustain.Chem.Pharm.* — 2016. — Vol. 3. — P. 59–68.
425. Shao H, Xu L, Yan Y: Biochemical characterization of a carboxylesterase from the archaeon *Pyrobaculum* sp. 1860 and a rational explanation of its substrate specificity and thermostability // *Int. J. Mol. Sci.* — 2014. — Vol. 15. — P. 16885-16910.
426. Shi H., Zhang Y., Li X., Huang Y., Wang L., Wang, Y., Ding H., Wang F. A novel highly thermostable xylanase stimulated by Ca^{2+} from *Thermotoga thermarum*: cloning, expression and characterization // *Biotechnol.Biofuels* — 2013. — Vol. 6. — P. 26.
427. Shi L., Squier T.C., Zachara J.M., Fredrickson J.K. Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multihaem c-type cytochromes // *Mol. Microbiol.* — 2007. — Vol. 65. — P. 12–20.
428. Shimizu S., Akiyama M., Ishijima Y., Hama K., Kunimaru T., Naganuma T. Molecular characterization of microbial communities in fault-bordered aquifers in the Miocene formation of Northernmost Japan // *Geobiology.* — 2006. — Vol. 4. — P. 203-213.
429. Shirodkar S., Reed S., Romine M., Saffarini D. The octahaem SirA catalyses dissimilatory sulfite reduction in *Shewanella oneidensis* MR-1 // *Environ. Microbiol.* — 2011. — Vol. 13. — P. 108–115.
430. Simon J., Kern M. Hermann B., Einsle O., Butt J.N. Physiological function and catalytic versatility of bacterial multihaem cytochromes c involved in nitrogen and sulfur cycling // *Biochem.Soc.Trans.* — 2011. — Vol. 39. — P. 1864–1870.
431. Simon J., Klotz M.G. Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations // *Biochim. Biophys. Acta* — 2013. — Vol. 1827. — P. 114–135.
432. Simon J., Kroneck P.M.H. Microbial sulfite respiration // *Adv. Microbial Physiol.* — 2013. — Vol. 62. — P. 45–117.
433. Skerman V.B.D., McGowan V., Sneath P.H.A. (editors): Approved Lists of Bacterial Names // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 1980. — Vol. 30. — P. 225-420.
434. Slepova T.V., Sokolova T.G. Kolganova, T.V., Tourova T.P., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Carboxydotherrmus siderophilus* sp. nov., a thermophilic, hydrogenogenic, carboxydophilic, dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium from a Kamchatka hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2009. — Vol. 59. — P. 213-217.
435. Slobodkin A.I., Wiegel J. Fe(III) as an electron acceptor for H_2 oxidation in thermophilic anaerobic enrichment cultures from geothermal areas // *Extremophiles.* — 1997. — Vol. 1. — P. 106109.
436. Slobodkin A.I., Reysenbach A.-L., Strutz N., Dreier M., Wiegel J. *Thermoterrabacterium ferrireducens* gen. nov., sp. nov. a thermophilic anaerobic,

- dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium from a continental hot spring // *Int. J. Syst. Bacteriol.* —1997. —Vol. 47. — P. 541-547.
437. Slobodkin A.I., Sokolova T.G., Lysenko A.M., Wiegel J. Reclassification of *Thermoterrabacterium ferrireducens* as *Carboxydothemus ferrireducens* comb. nov., and emended description of the genus *Carboxydothemus* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2006. —Vol. 56. — P. 2349-2351.
438. Slobodkin A.I., Tourova T.P., Kostrikina N.A., Lysenko A.M., German K.E., Bonch-Osmolovskaya E.A., Birkeland N.-K. (2006) *Tepidimicrobium ferriphilum* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, Fe(III)- reducing bacterium of the order *Clostridiales* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2006. — Vol. 56. — P. 369-372.
439. Slobodkin A.I., Reysenbach A.-L., Slobodkina G.B., Baslerov R.V., Kostrikina N.A., Wagner I.D., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Thermosulfurimonas dismutans* gen. nov., sp. nov. a novel extremely thermophilic sulfur-disproportionating bacterium from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2012. — Vol. 62. — P. 2565-2571.
440. Slobodkin A.I., Reysenbach A.-L., Slobodkina G.B., Kolganova T.V., Kostrikina N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Dissulfuribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov. a novel thermophilic autotrophic sulfur-disproportionating deeply-branching delta-proteobacterium from a deep-sea hydrothermal vent of the Eastern Lau Spreading Center // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2013. — Vol. 63. — P. 1967-1971.
441. Slobodkin A.I., Slobodkina G.B., Panteleeva A.N., Chernyh N.A., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Dissulfurimicrobium hydrothermalis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, autotrophic, sulfur-disproportionating deltaproteobacterium isolated from a hydrothermal pond // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2016. — Vol. 66. — P. 1022-1026.
442. Slobodkina G.B., Kolganova T.V., Chernyh N.A., Querellou J., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Deferribacter autotrophicus* sp. nov., an iron(III)-reducing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2009. —Vol. 59. — P. 1508-1512.
443. Slobodkina G.B., Kolganova T.V., Querellou J., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Geoglobus acetivorans* sp. nov., an iron(III)-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 2009. — Vol. 59. — P. 2880–2883.
444. Slobodkina G.B., Panteleeva A.N., Sokolova T.G., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Carboxydocella manganica* sp. nov., a thermophilic, dissimilatory Mn(IV) and Fe(III)-reducing bacterium from a Kamchatka hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2012. — Vol. 62. — P. 890-894.
445. Slobodkina G.B., Lebedinsky A.V., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Pyrobaculum ferrireducens* sp. nov., a hyperthermophilic Fe(III)-, selenite- and arsenate reducing crenarchaeon isolated from a hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2015. — Vol. 65. — P. 851–856.
446. Smith J.A., Aklujkar M., Risso C., Leang C., Giloteaux L., Holmes D.E. Mechanisms involved in Fe(III) respiration by the hyperthermophilic archaeon *Ferroglobus placidus* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2015. — Vol. 81. — P. 2735–2744.
447. Smith N.R., Gordon R.E., Clark F.E. Aerobic sporeforming bacteria. U.S. Dept. Agr. Monograph. — 1952. — N 16.
448. Sokolova T.G., González J.M., Kostrikina N.A., Chernyh N.A., Slepova T.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Robb F.T. *Thermosinus carboxydivorans* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, carbon-monoxide-oxidizing, hydrogenogenic bacterium from a hot pool of Yellowstone National Park // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2004. — Vol. 54. — P. 2353-2359.

449. Sokolova T.G., Henstra A.M., Sipma J., Parshina S.N., Stams A.J., Lebedinsky A.V. Diversity and ecophysiological features of thermophilic carboxydrotrophic anaerobes // FEMS Microbiol. Ecol. — 2009. — Vol. 68. — P. 131–141.
450. Sonne-Hansen J., Ahring B.K. *Thermodesulfobacterium hveragerdense* sp. nov., and *Thermodesulfovibrio islandicus* sp. nov., two thermophilic sulfate reducing bacteria isolated from a Icelandic hot spring // Syst. Appl. Microbiol. — 1999. — Vol. 22. — P. 559–564.
451. Sorokin D.Y., Muyzer G. Haloalkaliphilic spore-forming sulfidogens from soda lake sediments and description of *Desulfitispora alkaliphila* gen. nov., sp. nov. // Extremophiles. — 2010. — Vol. 14. — P. 313–320.
452. Spiro S. Regulators of bacterial responses to nitric oxide // FEMS Microbiol. Rev. — 2007. — Vol. 31. — P. 193–211.
453. Spurr A.R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy // J. Ultrastruct. Res. — 1969. — Vol. 26. — P. 31–43.
454. Stackebrandt E. The family *Thermoanaerobacteraceae* / In: Rosenberg EЮ, DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. et al. (editors). The Prokaryotes. Firmicutes and Tenericutes, 4th ed. Berlin: Springer — 2013. — P. 413–419.
455. Starkey R.L., Halvorson H.O. Studies on the transformations of iron in nature. II. Concerning the importance of microorganisms in the solution and precipitation of iron // Soil Sci. — 1927. — Vol. 24. — P. 381–402.
456. Steinsbu B.O., Thorseth I.H., Nakagawa S., Inagaki F., Lever M.A., Engelen B., Øvreas L., Pedersen R.B. *Archaeoglobus sulfaticallidus* sp. nov., a thermophilic and facultatively lithoautotrophic sulfate-reducer isolated from black rust exposed to hot ridge flank crustal fluids // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2010. — Vol. 60. — P. 2745–2752.
457. Steinsbu B.O., Tindall B.J., Torsvik V.L., Thorseth I.H., Daae F.L., Pedersen R.B. *Rhabdothermus arcticus* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Thermaceae* isolated from a hydrothermal vent chimney in the Soria Moria vent field on the Arctic Mid-Ocean Ridge // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2011. — Vol. 61. — P. 2197–2204.
458. Stetter K.O., Thomm M., Winter J., Wildgruber G., Huber H., Zillig W., Janecovic D., König H., Palm P., Wunderl S. *Methanothermus fervidus*, sp. nov., a novel extremely thermophilic methanogen isolated from an Icelandic hot spring / Zbl. Bakt. Hyg., I. — 1981. — Abt. Orig. C 2. — P. 166–178.
459. Stetter K.O., König H., Stackebrandt E. *Pyrodictium* gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulphur reducing archaeobacteria growing optimally at 105°C // Syst. Appl. Microbiol. — 1983. — Vol. 4. — P. 535–551.
460. Stetter K.O. Hyperthermophiles - physiology and enzymes // J. Chem. Technol. Biotechnol. — 1988a. — Vol. 42. — P. 315–317.
461. Stetter K.O. *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov., sp. nov. a new taxon of extremely thermophilic archaeobacterial // Syst. Appl. Microbiol. — 1988b. — Vol. 10. — P. 172–173.
462. Stetter K.O. Order III. *Sulfolobales* ord. nov. Family *Sulfolobaceae* fam. nov. / Staley J.T., Bryant M.P., Pfennig N., Holt J.G. (editors). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: The Williams & Wilkins Co. — 1989. — Vol. 3. — P. 2250–2251.
463. Stetter K.O. Hyperthermophilic procaryotes // FEMS Microbiol. Rev. — 1996. — Vol. 18. — P. 149–158.
464. Stetter K.O. Extremophiles and their adaptation to hot environments // FEBS Letters. — 1999. — Vol. 452. — P. 22–25.
465. Stetter K.O. Hyperthermophiles in the history of life // Phil. Trans. R. Soc. B. — 2006. — Vol. 361. — P. 1837–1843.

466. Stetter K.O. A brief history of the discovery of hyperthermophilic life // *Biochem. Soc. Trans.* — 2013. — Vol. 41, — P. 416–420.
467. Steudel R., Holz B. (1988) Detection of reactive sulfur molecules (S₆, S₇, S₉, S_m) in commercial sulfur, in sulfur minerals, and in sulfur metals slowly cooled to 201°C // *Z. Naturforsch.* — 1988. — B43. — P. 581–589.
468. Stieglmeier M., Kling A., Alves R.J.E., Rittmann S.K.-M.R., Melcher M., Leisch N., Schleper C. *Nitrososphaera viennensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon from soil and a member of the archaeal phylum *Thaumarchaeota* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2014. — Vol. 64. — P. 2738–2752.
469. Stockdreher Y., Venceslau S. S., Josten M., Sahl H. G., Pereira I. A. C., Dahl. C. Cytoplasmic sulfur transferases in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: evidence for sulfur transfer from DsrEFH to DsrC // *PLoS One* 7. — 2012. — e40785.
470. Straub K.L., Benz M., Schink B. Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH // *FEMS Microbiol. Ecol.* — 2001. — Vol. 34. — P.181-186.
471. Strohm T.O., Griffin B., Zumft W.G., Schink B. Growth yields in bacterial denitrification and nitrate ammonification // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2007. — Vol. 73. — P. 1420–1424.
472. Strous M., Fuerst J.A., Kramer E.H.M., Logemann S., Muyzer, G., van de Paschoonen K.T., Webb R.I., Kuenen J.G., Jetten M.S.M. Missing lithotroph identified as new planctomycete // *Nature.* — 1999. — Vol. 400. — P. 446–449.
473. Suharti, Strampraad M.J.F., Schroder I., de Vries S. A novel copper containing menaquinol NO reductase from *Bacillus azotoformans* // *Biochemistry.* — 2001. — Vol. 40. — P. 2632–2639.
474. Suharti, de Vries S. Membrane-bound denitrification in the Gram-positive bacterium *Bacillus azotoformans* // *Biochem. Soc. Trans.* — 2005. — Vol. 33. — P. 130–133.
475. Szewzyk U., Szewzyk R., Stenström T.-A. Thermophilic, anaerobic bacteria isolated from a deep borehole in granite in Sweden // *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* — 1994. — Vol. 91. — P. 1810-1813.
476. Takai K., Sugai A., Itoh T., Horikoshi K. *Palaeococcus ferrophilus* gen. nov., sp. nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2000. — Vol. 50. — P. 489–500.
477. Takai K., Hirayama H., Sakihama Y., Inagaki F., Yamato Y., Horikoshi K. Isolation and metabolic characteristics of previously uncultured members of the order *Aquificales* in a subsurface gold mine // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2002. — Vol. 68. — P. 3046–3054.
478. Takai K., Kobayashi H., Nealson K.H., Horikoshi K. *Sulfurihydrogenibium subterraneum* gen. nov., sp. nov., from a subsurface hot aquifer // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2003a. — Vol. 53. — P. 823-827.
479. Takai K., Kobayashi H., Nealson K. H., Horikoshi K. *Deferribacter desulfuricans* sp. nov., a novel sulfur-, nitrate- and arsenate-reducing thermophile isolated from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2003b. — Vol. 53. — P. 839–846.
480. Takai K., Nealson K. H., Horikoshi K. *Hydrogenimonas thermophila* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph within the ϵ -Proteobacteria, isolated from a black smoker in a Central Indian Ridge hydrothermal field // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2004. — Vol. 54. — P. 25-32.
481. Takai K., Nakamura K., Toki T., Tsunogai U., Miyazaki M., Miyazaki J., Hirayama H., Nakagawa S., Nunoura T., Horikoshi K. Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2008. — Vol. 105. — P. 10949–10954.
482. Takai K., Miyazaki M., Hirayama H., Nakagawa S., Querellou J., Godfroy A. Isolation and physiological characterization of two novel, piezophilic, thermophilic

- chemolithoautotrophs from a deep-sea hydrothermal vent chimney // *Environ. Microbiol.* — 2009. — Vol. 11. — P. 1983–1997.
483. Takami H., Noguchi H., Takaki Y., Uchiyama I., Toyoda A., Nishi S., Chee G.-J., Arai A., Nunoura T., Itoh T., Hattori M., Takai K. A deeply branching thermophilic bacterium with an ancient Acetyl-CoA pathway dominates a subsurface ecosystem // *PLoS ONE.* — 2012. — 7(1): e30559.
484. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 // *Mol. Biol. Evol.* — 2007. — Vol. 24. — P. 1596–1599.
485. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. Evol.* — 2011. — Vol. 28. — P. 2731–2739.
486. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // *Mol. Biol. Evol.* — 2013. — Vol. 30. — P. 2725–2729.
487. Tavares P., Pereira A.S., Moura J.J.G., Moura I. Metalloenzymes of the denitrification pathway // *J. Inorganic Biochem.* — 2006. — Vol. 100. — P. 2087–2100.
488. Thamdrup B., Finster K., Hansen J. W., Bak F. Bacterial disproportionation of elemental sulfur coupled to chemical reduction of iron or manganese // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1993. — Vol. 59. — P. 101–108.
489. Thamdrup B. (2000) Bacterial manganese and iron reduction in aquatic sediments // *Adv. Microb. Ecol.* — 2000. — Vol. 16. — P. 41–84.
490. Tice M.M., Lowe D.R. Photosynthetic microbial mats in the 3,416-Myr-old ocean // *Nature.* — 2004. — Vol. 431. — P. 549–552.
491. Tiedje J.M., Sexstone A.J., Myrold D.D., Robinson J.A. Denitrification: ecological niches, competition and survival // *Antonie van Leeuwenhoek* — 1982. — Vol. 48. — P. 569–583.
492. Tikhonova T.V., Slutsky A., Antipov A.N., Boyko K.M., Polyakov K.M., Sorokin D.Y., Zvyagilskaya R.A., Popov V.O. Molecular and catalytic properties of a novel cytochrome c nitrite reductase from nitrate-reducing haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio nitratireducens* // *Biochim. Biophys. Acta – Proteins and Proteomics* — 2006. — Vol. 1764. — P. 715–723.
493. Tindall B.J., Rosselló-Móra R., Busse H.-J., Ludwig W., P. Kämpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2010. — Vol. 60. — P. 249–266/
494. Tor J., Lovley D.R. Anaerobic degradation of aromatic compounds coupled to Fe(III) by *Ferroglobus placidus* // *Environ. Microbiol.* — 2001. — Vol. 3. — P. 281–287.
495. Tor J. M., Kashefi K., Lovley D. R. Acetate oxidation coupled to Fe(III) reduction in hyperthermophilic microorganisms // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2001. — Vol. 67. — P. 1363–1365.
496. Trüper H. G., Schlegel H. G. Sulfur metabolism in *Thiorhodaceae*. I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii* // *Antonie van Leeuwenhoek* — 1964. — Vol. 30. — P. 225–238.
497. Tsubota J., Eshinimaev B. T., Khmelenina V. N., Trotsenko Y. A. *Methylothermus thermalis* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic obligate methanotroph from a hot spring in Japan // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2005. — Vol. 55. — P. 1877–1884.
498. Turner P., Mamo G., Karlsson E.N. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining // *Microbial Cell Factories.* — 2007. — 6:9 doi:10.1186/1475-2859-6-9

499. Urbietta M.S., Donati E.R., Chan K.-G., Shahar S., Sin L.L., Goh K.M. Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications // *Biotechnol. Adv.* — 2015. — Vol. 33. — 633–647.
500. Urich T., Gomes C.M., Kletzin A., Frazao C. X-ray structure of a self-compartmentalizing sulfur cycle metalloenzyme // *Science.* — 2006. — Vol. 311. — P. 996–1000.
501. Utkin I., Woese C., Wiegel J. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 1994. — Vol. 44. — P. 612-619.
502. Van de Graaf A.A., Mulder A., Slijkhuis H., Robertson L.A., Kuenen J.G. (1990) Anoxic ammonium oxidation. / Christiansen C., Munck L. and Villadsen J. (editors). In: Proc. 5th European Congress on Biotechnology, Munksgaard International Publisher, Copenhagen — 1990. — Vol. 1. — P. 388-391.
503. van de Graaf A.A., Mulder A., de Bruijn P., Jetten M.S.M., Robertson L. A., Kuenen J. G. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1995. — P. 1246-1251.
504. Van de Graaf A.A., De Bruijn P., Robertson L.A., Jetten M.S.M., Kuenen J.G. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor // *Microbiology.* — 1996. — Vol. 142. — P. 2187–2196.
505. van Kessel M.A.H.J., Speth D.R., Albertsen M., Nielsen P.H., Op den Camp H.J.M., Kartal B., Jetten M.S.M., Lüscher S. Complete nitrification by a single microorganism // *Nature.* — 2015. — Vol. 528. — P. 555-559.
506. Van der Maarel M., Van der Veen B., Uitdehaag H., Leemhuis H., Dijkhuizen, L. Properties and applications of starch converting enzymes of the α -amylase family // *J. Biotechnol.* — 2002. — Vol. 94. — P. 137–155.
507. van Niftrik L. Cell biology of unique anammox bacteria that contain an energy conserving prokaryotic organelle // *Antonie van Leeuwenhoek.* — 2013. — Vol. 104. — P. 489–497.
508. Vargas M., Malvankar N.S., Tremblay P.L., Leang C., Smith J., Patel P., Synoeybos-West O., Nevin K.P., Lovley D.R. (2013) Aromatic amino acids required for pili conductivity and long-range extracellular electron transport in *Geobacter sulfurreducens* // *mBio.* — 2013. — Vol. 4 — e00105–13.
509. van Wolferen M., Ajon M., Driessen A.J.M., Albers S.-V. How hyperthermophiles adapt to change their lives: DNA exchange in extreme conditions // *Extremophiles.* — 2013. — Vol. 17. — 545–563.
510. Vielle C., Zeikus G.J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2001. — Vol. 65. — P. 1-43.
511. Viljoen J.A., Fred E.B., W. H. Peterson W.H. The fermentation of cellulose by thermophilic bacteria // *J. Agr. Sci.* — 1926. — Vol. 16. — P. 1-17.
512. von Canstein H., Ogawa J., Shimizu S., Lloyd J.R. Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2008. — Vol. 74. — P. 615– 623.
513. Völkl P., Huber R., Drobner E., Rachel R., Burggraf S., Trincone A., Stetter K.O. *Pyrobaculum aerophilum* sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1993. — Vol. 59. — P. 2918–2926.
514. Voordeckers J.W., Do M.H., Hugler M., Ko V., Sievert S.M., Vetriani C. Culture dependent and independent analyses of 16S rRNA and ATP citrate lyase genes: a comparison of microbial communities from different black smoker chimneys on the Mid-Atlantic Ridge // *Extremophiles.* — 2008. — Vol. 12. — P. 627-640.

515. Wagner I.D., Wiegel J. Diversity of thermophilic anaerobes // Ann. N.Y.Acad.Sci. — 2008. — Vol. 1125. — P. 1–43.
516. Walker J.C.G. Was the Archaean biosphere upside down? // Nature. — 1987. — Vol. 329 — P. 710–712.
517. Waters E., Hohn M.J., Ahel I., Graham D.E., Adams M.D., Barnstead M., Beeson K.Y., Bibbs L., Bolanos R., Keller M., Kretz K., Lin X., Mathur E., Ni J., Podar M., Richardson T., Sutton G.G., Simon M., Soll D., Stetter K.O., Short J.M., Noordewier M. The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism // Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. — 2003. — Vol. 100. — P. 12984–12988.
518. Weber K.A., Achenbach L.A., Coates J.D. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction // Nat. Rev. Microbiol. — 2006. — Vol. 4. — P. 752-764.
519. Weinzirl J. The bacteriology of canned foods // Jour. Med. Res. — 1919. — Vol. 39. — P. 349.
520. Weiss M.C., Sousa F.L., Mrnjavac N., Neukirchen S., Roettger M., Nelson-Sathi S., Martin W.F. The physiology and habitat of the last universal common ancestor // Nat. Microbiol. — 2016. — Vol. 1. — P. 16116.
521. Westall F., Campbell K.A., Bréhéret J.G., Foucher F., Gautret P., Hubert A., Sorieul S., Grassineau N., Guido D.M. Archean (3.33 Ga) microbe-sediment systems were diverse and flourished in a hydrothermal context // Geology. — 2015. — Vol. 43. — P. 615–618;
522. Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J. Prokaryotes: the unseen majority. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — Vol. 95. — P. 6578–6583.
523. Wiegel J., Braun M., Gottschalk G. *Clostridium thermoautotrophicum* species novum, a thermophile producing acetate from molecular hydrogen and carbon dioxide // Cur. Microbiol. — 1981. — Vol. 5. — P. 255-260.
524. Winderl C., Anneser B., Griebler C., Meckenstock R.U., Lueders T. Depth-resolved quantification of anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community patterns in distinct redox zones of a tar oil contaminant plume. // Appl. Environ. Microbiol. — 2008. — Vol. 74. — P. 792-801.
525. Winogradsky S. Sur l'assimilation de l'azote gazeux de l'atmosphère par les microbes // C. R. Acad. Sci. — 1883. — Vol. 116. P.: 1385– 1388; Vol. 118. — P. 353–355.
526. Winogradsky S. Über Schwefelbakterien // Bot. Zeit. — 1887. — Vol. 45. — P. 489–610.
527. Winogradsky S. Über Eisenbakterien // Bot. Zeitung. — 1888. — Vol. 46. — P. 262-270.
528. Winogradsky S. Recherches sur les Organismes de la Nitrification //. Comp Rendu. — 1890. — Vol. 110. — P. 1013–1016.
529. Winogradsky S. Recherches sur l'assimilation de l'azote libre de l'atmosphère par les microbes // Arch. Sci. Biol., St. Petersburg — 1894. — Vol. 95. — P. 297-352.
530. Woese C.R., Fox G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 87. — P. 4576-4579.
531. Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1990. — Vol. 87. — P. 4576-4579.
532. Woods D.D. The reduction of nitrate to ammonia by *Clostridium welchii* //Biochemical Journal. — 1938. — Vol. 32. — P. 2000-2012.
533. Wrighton K.C., Thrash J.C., Melnyk R.A., Bigi J.P., Byrne-Bailey K.G., Remis J.P., Schichnes D., Auer M., Chang C.J., Coates J.D. Evidence for direct electron transfer by

- a Gram-positive bacterium isolated from a microbial fuel cell // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2011. — Vol. 77. — P. 7633–7639.
534. Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. Formation of methane by bacterial extracts // *J. Biol. Chem.* — 1963. — Vol. 238. — P. 2882–2886.
535. Xie W., Wang F., Guo L., Chen Z Sievert S.M., Meng J., Huang G., Li Y., Yan Q., Wu S., Wang X., Chen S., He G., Xiao X., Xu A. Comparative metagenomics of microbial communities inhabiting deep-sea hydrothermal vent chimneys with contrasting chemistries // *The ISME Journal.* — 2011. — Vol. 5. — P. 414–426.
536. Yamane K., Hattori Y., Ohtagaki H., Fujiwara K. Microbial diversity with dominance of 16S rRNA gene sequences with high GC contents at 74 and 98C subsurface crude oil deposits in Japan // *FEMS Microbiol. Ecol.* — 2011. — Vol.76. — P. 220–235.
537. Yarza P., Yilmaz P., Pruesse E., Glöckner F.-O., Ludwig W., Schleifer K.-H., Whitman W.B., Euzéby J., Amann R., Rosselló-Móra R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2014. — Vol. 12. — P. 653–645.
538. Yoneda Y., Yoshida T., Yasuda H., Imada C., Sako Y. A thermophilic, hydrogenogenic and carboxydrotrophic bacterium, *Calderihabitans maritimus* gen. nov., sp. nov., from a marine sediment core of an undersea caldera // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2013. — Vol. 63. — P. 3602–3608.
539. Yim K.J., Song H.S., Choi J.-C., Roh S.W. *Thermoproteus thermophilus* sp. nov., a hyperthermophilic crenarchaeon isolated from solfataric soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2015. — Vol. 65. — P. 2507–2510.
540. Yoneda Y., Yoshida T., Kawaichi S., Daifuku T., Takabe K., Sako Y. *Carboxydotherrmus pertinax* sp. nov., a thermophilic, hydrogenogenic, Fe(III)-reducing, sulfur-reducing carboxydrotrophic bacterium from an acidic hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2012. — Vol. 62. — P. 1692–1697.
541. Yoon, S., Cruz-Garcia C., Sanford R., Ritalahti K.M., Löffler F.E. Denitrification versus respiratory ammonification: environmental controls of two competing dissimilatory $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ reduction pathways in *Shewanella loihica* strain PV-4 // *ISMEJ.* — 2015. — Vol. 9. — P. 1093–1104.
542. Yoon S.H., Ha S.M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H., Chun, J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2017. — Vol. 67. — P. 1613–1617.
543. Yoshida N., Nakasato M., Ohmura N., Ando A., Saiki H., Ishii M., Igarashi Y. *Acidianus manzaensis* sp. nov., a novel thermoacidophilic Archaeon growing autotrophically by the oxidation of H_2 with the reduction of Fe^{3+} // *Curr. Microbiol.* — 2006. — Vol. 53. — P. 406–411.
544. 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 // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2010. — Vol. 76. — P. 5500–5509.
545. Zavarzina D.G., Tourova T.P., Kuznetsov B.B., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A. I. *Thermovenabulum ferriorganovororum* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic, endospore-forming bacterium // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2002. — Vol. 52. — P. 1737–1743.
546. Zeng, X., Zhang X., Jiang L., Alain K., Jebbar M., Shao Z. *Palaeococcus pacificus* sp. nov., an archaeon from deep-sea hydrothermal sediment // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2013. — Vol. 63. — P. 2155–2159.
547. Zillig W., Stetter K.O., Janekovic D. DNA-dependent RNA polymerase from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius* // *Eur. J. Biochem.* — 1979. — Vol. 96. — P. 597–604.

548. Zillig W., Stetter K.O., Wunderl S., Schulz W., Priess H., Scholz S. The *Sulfolobus*-*Caldariella* group: taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases // Arch. Microbiol. — 1980. — Vol. 125. — P. 259-269.
549. Zillig W., Stetter K.O., Schäfer W., Janekovic D., Wunderl S., Holz I., Palm P. *Thermoproteales*: a novel type of extremely thermoacidophilic anaerobic archaeobacteria isolated from Icelandic solfataras // Zbl. Bakt. Hyg., I. — 1981. — Abt. Orig. C 2. — P. 205–227.
550. Zoëphel A., Kennedy M.C., Beinert Z.H., Kroneck P.M.H. Investigations on microbial sulfur respiration. 1. Activation and reduction of elemental sulfur in several strains of eubacteria // Arch. Microbiol. — 1988. — Vol. 150. — P. 72-77.
551. Zumft W.G. Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type // J. Inorg. Chem. — 2005. — Vol. 99. — P. 194–215.