На правах рукописи

СЛОБОДКИНА Галина Борисовна

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

Специальность 03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

доктора биологических наук

МОСКВА – 2018

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

Научный консультант **Бонч-Осмоловская Елизавета Александровна,**
доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующая отделом биологии экстремофильных микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Официальные оппоненты: **Вайнштейн Михаил Борисович,**
доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией физиологии микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук»

Грабович Маргарита Юрьевна,
доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии и физиологии клетки Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет»

Карначук Ольга Викторовна,
доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой физиологии растений и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

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

Защита состоится 17 октября 2018 г. в 10.00 ч. на заседании диссертационного совета Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке ИНМИ РАН по адресу 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2 и на сайте http://fbras.ru/.

Автореферат разослан « » 2018 года

Ученый секретарь диссертационного совета **доктор биологических наук Хижняк Татьяна Владимировна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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^{o}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), 22 имеют термофильных представителей. Больше всего термофилов 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.

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 и моноксид 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^{o}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^{o}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 элементной серы (Bak & Cypionka, 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 (Könneke 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 высокопроизводительного 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 мультигемовые 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 хемолитоавтрофный облигатный сульфитредуктор *Thermodesulfitimonas autotrophica*.

Выделен наиболее высокотемпературный анаэробный представитель класса *Gammaproteobacteria – Inmirania thermothiophila*, способный к росту при температуре до 68^{o}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.

Апробация результатов

Материалы диссертации доложены и обсуждены на международных и российских конференциях и симпозиумах:

1. 7th International Congress on Extremophiles. Capetown, South Africa. 2008.
2. 8th International Congress on Extremophiles. Ponta Delgada, Portugal. 2010.
3. 4th FEMS Congress of European Microbiologists. Geneva, Switzerland. 2011.
4. 9th International Congress on Extremophiles. Sevilla, Spain. 2012.
5. EMBO Workshop *Planctomycetes-Verrucomicrobia-Chlamydiae* Superphylum: Exceptions to the bacterial definition? Heidelberg, Germany. 2013.
6. 12th International Meeting on Thermophiles. Regensburg, Germany. 2013.
7. EMBO Workshop Microbial sulfur metabolism. Helsingør, Denmark. 2015.
8. 11th International Congress on Extremophiles. Kyoto, Japan. 2016.
9. V Съезд Биохимиков России. Сочи. 2016.
10. 7th FEMS Congress of European Microbiologists. Valencia, Spain. 2017.

Публикации

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

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.

Место проведения работы

Работа была выполнена в Институте микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН в лаборатории гипертермофильных микробных сообществ, руководимой член-корр. РАН д.б.н. Е.А. Бонч-Осмоловской. Электронно-микроскопические исследования были выполнены в ИНМИ РАН Н.А. Кострикиной. Определение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и полногеномное секвенирование проводились в Центре Биоинженерии РАН Т. В. Колгановой, А.Н. Пантелеевой, Р.В. Баслеровым, А.В. Мардановым и Н.В. Равиным.

Хемотаксономические исследования проводились в Российском государственном университете нефти и газа им. И.М. Губкина А.А. Новиковым. Соискатель выражает глубокую благодарность всем упомянутым участникам данной работы.

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 элементной 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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. Пробы из глубоководных морских гидротерм были отобраны в совместных с

соавторами публикаций научных рейсах (поле Ашадзе, Срединно-Атлантического Хребта, 2007 г. и поля спредингового центра Восточное Лау, Тихий океан, 2009 г.). Пробы из подземных местообитаний были любезно предоставлены сотрудником лаборатории нефтяной микробиологии ИНМИ РАН Борзенковым И.А. (Северо-Ставропольское подземное хранилище газа) и проф. Университета г. Блумфонтейн (ЮАР) Э. ван Херден (золотодобывающая шахта Беатрикс).

Для получения и культивирования накопительных и чистых культур микроорганизмов были использованы низкоминерализованная среда (модифицированная среда Пфеннига (Pfennig, 1965)) и среда морской солености. Во все среды добавляли 1 мл/л раствора микроэлементов (Slobodkin et al., 1997, 2012) и 1 мл/л раствора витаминов (Wolin et al., 1963). Все среды готовили анаэробно с применением модифицированной техники Хангейта (Жилина и Заварзин, 1978; Ljungdahl & Wiegel, 1986) под током CO_2 (100% в газовой фазе). Как правило, среды не содержали восстанавливающих агентов. При использовании сред, предварительно восстановленных $Na_2S \times 9H_2O$, в них также добавляли резазурин. Нерастворимый оксид Fe(III) (ферригидрит) готовили путём титрования раствора $FeCl_3 \times 6H_2O$ раствором NaOH до pH 8.0-9.0. Нерастворимый оксид Mn(IV) готовили путем окисления кислородом воздуха раствора $MnCl_2 \times 4H_2O$ в щелочных условиях. Культивирование накопительных и чистых культур проводили в пробирках Хангейта (Bellco Glass) объёмом 17 мл с 10 мл жидкой среды. Для исследования роста за счет диспропорционирования элементной 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^{o}C (2 ати) в течение 60 мин. 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; элементная 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 накопительных культур, восстанавливающих железо или марганец, 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 путём инокуляции (10% об./об.) образца в анаэробную среду и культивировании при температурах 50-85^{o}C. Чистые культуры выделяли методом предельных разведений на жидкой среде с последующим получением отдельных колоний в анаэробной агаризованной среде. Описание новых таксонов микроорганизмов осуществляли в соответствии с правилами, предъявляемыми Международным комитетом по систематике прокариот к описанию новых таксонов микроорганизмов. Количество клеток определяли прямым подсчётом с помощью световой микроскопии. Диапазоны температуры, pH, концентрации NaCl, хемотаксономические характеристики определяли по описанным методикам (Slobodkina et al. 2013, 2016). Растворимые доноры 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. Газообразные доноры или акцепторы электронов (H_2, CO, O_2, SO_2) 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 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. Об использовании потенциального акцептора электронов судили по увеличению конечной концентрации клеток по сравнению с контролем и по образованию продуктов восстановления. В качестве контроля проверяли рост культуры на той же среде без добавления акцептора. Двухвалентное железо измеряли спектрофотометрически с 2,2’-дипиридилом (Резников и др. 1970);

количество образующегося Mn(II) определяли фотометрическим методом с применением формальдоксима (Goto et al., 1962). Сульфид измеряли колориметрически с диметил-*p*-фенилендиамином (Trüper & Schlegel, 1964). Нитрит определяли при помощи тест-полосок Nitrate-Test strips (MQuantTM, Merck KGaA); концентрацию аммония определяли с реактивом Несслера или с фенол-гипохлоритом (Герхардт и др., 1983; Chaney & Marbach, 1962). Газообразные продукты метаболизма определяли с помощью газового хроматографа. Анализ короткоцепочечных органических кислот, спиртов, сахаров, глицерина, а также определение концентраций нитрата и сульфата проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Применённые в работе электронно-микроскопические и молекулярно-биологические методы описаны в полном тексте диссертации и соответствующих публикациях.

Сравнение нуклеотидных последовательностей проводили при помощи он-лайн сервисов BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) или EzTaxon-e server (http://www.ezbiocloud.net/eztaxon). Филогенетический анализ микроорганизмов проводили с использованием программ, входящих в пакет программ для филогенетического анализа MEGA (Tamura et al., 2013). Этот же пакет программ использовали для построения филогенетических деревьев.

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-Xaa-Xaa-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/).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. НОВЫЕ ТЕРМОФИЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ АЗОТА В ЭНЕРГЕТИЧЕСКОМ МЕТАБОЛИЗМЕ

Восстановление соединений азота могло играть одну из главных ролей 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 нитратредукторов: органотрофные микроорганизмы, использующие в качестве донора электронов для восстановления нитрата органические соединения, и литотрофные нитратредуцирующие бактерии, окисляющие соединения серы в анаэробных условиях.

1.1.ОРГАНОТРОФНЫЕ НИТРАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

1.1.1. Общая характеристика новых термофильных органотрофных нитратвосстанавливающих бактерий

Три штамма термофильных бактерий, выделенные из подземных местообитаний и мелководной морской гидротермы, были описаны и узаконены как новые таксоны (Таблица 1). Все выделенные организмы являются облигатными органотрофами, потребляющими простые и сложные углеводы (Таблица 2). *Tepidibacillus fermentans* также может использовать некоторые белковые соединения и органические кислоты. Все изоляты являются факультативными анаэробами и микроаэрофилами, способными к дыхательному метаболизму с кислородом или нитратом в качестве конечного акцептора электронов. Могут использовать и другие

акцепторы электронов, такие как нитрит, элементную серу или тиосульфат. Все выделенные бактерии кроме дыхания обладают и бродильным типом метаболизма.

Таблица 1. Таксономическое положение и местообитания новых органотрофных нитратвосстанавливающих бактерий

Организм, статус	Таксономическое положение*	Местообитание, описание образца
Tepidibacillus fermentans gen. nov. sp. nov	*Firmicutes - Bacilli - Bacillales*	Северо-Ставропольское подземное газохранилище (Россия). Пластовая вода и осадок
Thermogutta hypogea gen. nov. sp. nov.	*Planctomycetes-Planctomycetacia-Planctomycetales-Planctomycetaceae*	Золотодобывающая шахта Беатрикс (ЮАР) (глубина 1375 м). Трещинная вода
Thermostilla marina gen. nov. sp. nov.	*Planctomycetes-Planctomycetacia-Planctomycetales-Planctomycetaceae*	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)

Таблица 2. Морфологические и метаболические характеристики новых нитратредукторов

Организм	Морфология	Доноры электронов	Акцепторы электронов	Метаболизм
Tepidibacillus fermentans STGH^T	Спорообразующие палочки 0.3 мкм толщиной и 2.0-4.0 мкм длиной	Белковые соединения, моно- и дисахариды, органические кислоты	NO_3^-, АХДС, S^0, $S_2O_3^{2-}$,O_2	Облигатный гетеротроф. Факультативный анаэроб, микроаэрофил. Дыхание, брожение
Thermogutta hypogea SBP2^T	Клетки овальные или каплевидные, 1.0-1.5 мкм диаметром, образующие агрегаты. Дочерние клетки подвижные; зрелые клетки неподвижны	Моно-, ди- и полисахариды, лактат	NO_3^-, NO_2^-, S^0, O_2	Облигатный гетеротроф Факультативный анаэроб, микроаэрофил. Дыхание, брожение
Thermostilla marina SVX8^T	Клетки овальные или каплевидные, 0.5-1.2 мкм диаметром, образующие агрегаты. Дочерние клетки подвижные; зрелые клетки неподвижны	Моно-, ди- и полисахариды, пируват	NO_3^-, S^0, O_2	Облигатный гетеротроф Факультативный анаэроб, микроаэрофил. Дыхание, брожение

1.1.2. Термофильные планктомицеты

Три микроорганизма, полученные из разных экосистем, находящихся на значительном расстоянии друг от друга - из наземного горячего источника о. Кунашир, (РФ), 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* (Рисунок 1).

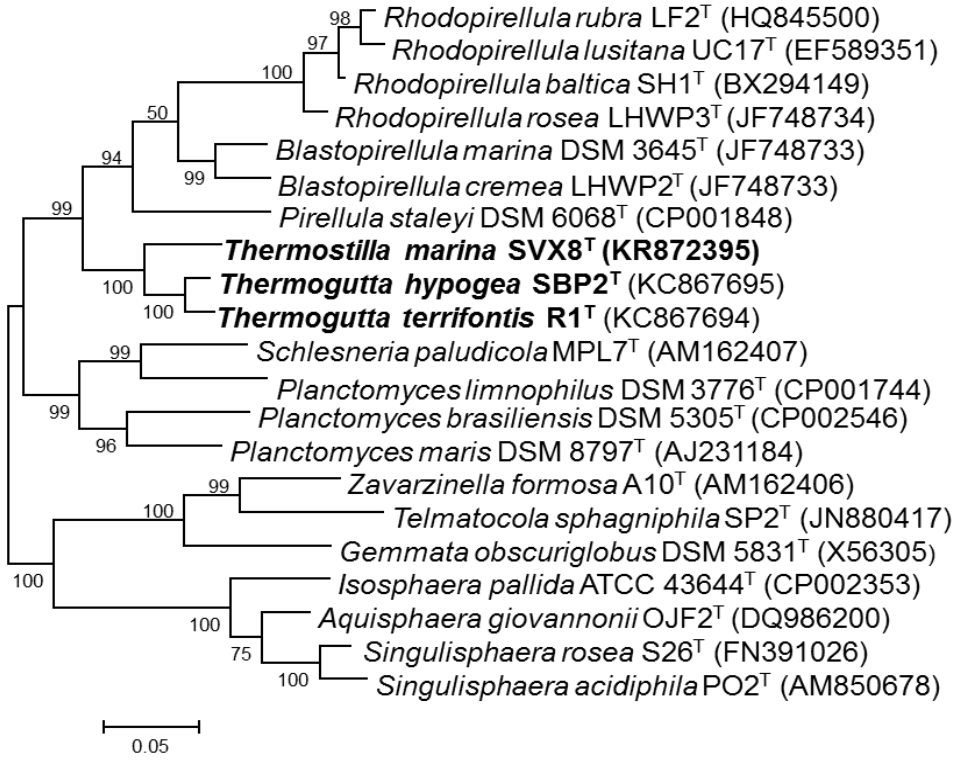

Рисунок 1. Дендрограмма, основанная на последовательности гена 16S рРНК, показывающая филогенетическое положение термофильных планктомицетов родов *Thermogutta* и *Thermostilla,* масштабная линейка – 5% различия последовательностей.

Несмотря на то, что планктомицеты известны довольно давно и были детектированы во многих 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. Описанные планктомицеты являются мезофильными бактериями ($T_{опт}$ не выше 35°C) за исключением одного вида, *Isosphaera pallida*, с оптимумом роста 41-42°C (Giovannoni et al., 1987). Выделенные нами микроорганизмы лучше всего растут при 52-60°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, а также устойчивость к антибиотикам пенициллинового ряда. Все эти свойства планктомицетов, как и спектр потребляемых субстратов оказались характерными и для термофильных видов (Рисунки 2-4, Таблица 3). Основные отличия новых изолятов 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. В составе клеточных жирных кислот, как и у мезофильных планктомицетов группы *Pirellula–Rhodopirellula–Blastopirellula* доминирует $C_{16:0}$, однако, в составе жирных кислот термофильных видов нет ненасыщенных кислот, что, возможно, является специфической чертой, присущей только термофильным планктомицетам.

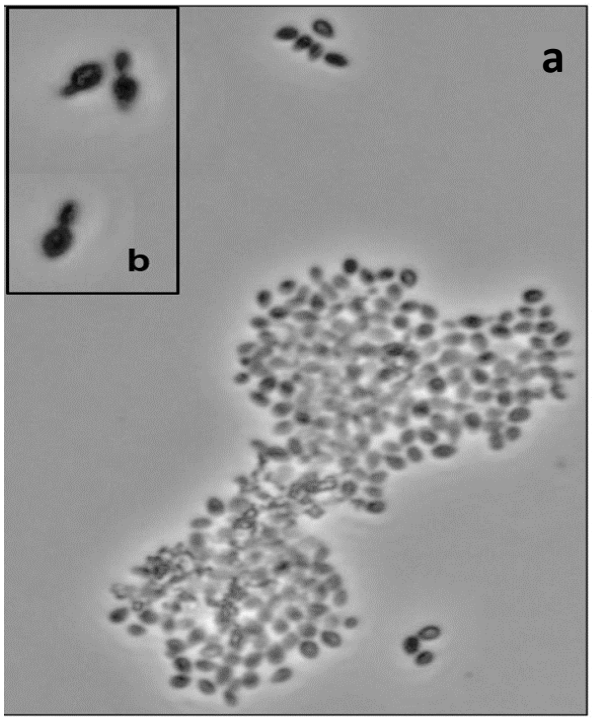

Рисунок 2. Морфология клеток *Thermogutta hypogea* SBP2^T(фазово-контрастная микроскопия), показывающая (a) агрегаты клеток, (b) почкующиеся клетки.

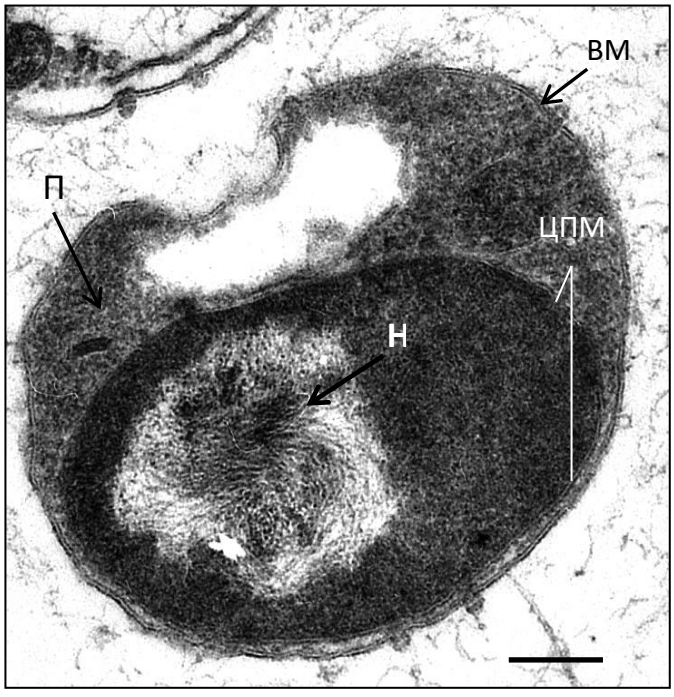

Рисунок 3. Ультратонкий срез клетки *Thermogutta hypogea* SBP2^T, показывающий нуклеоид (Н), цитоплазмитическую мембрану (ЦПМ), периплазму (П), внешнюю мембрану (ВМ); масштабная линейка, 0.1 мкм

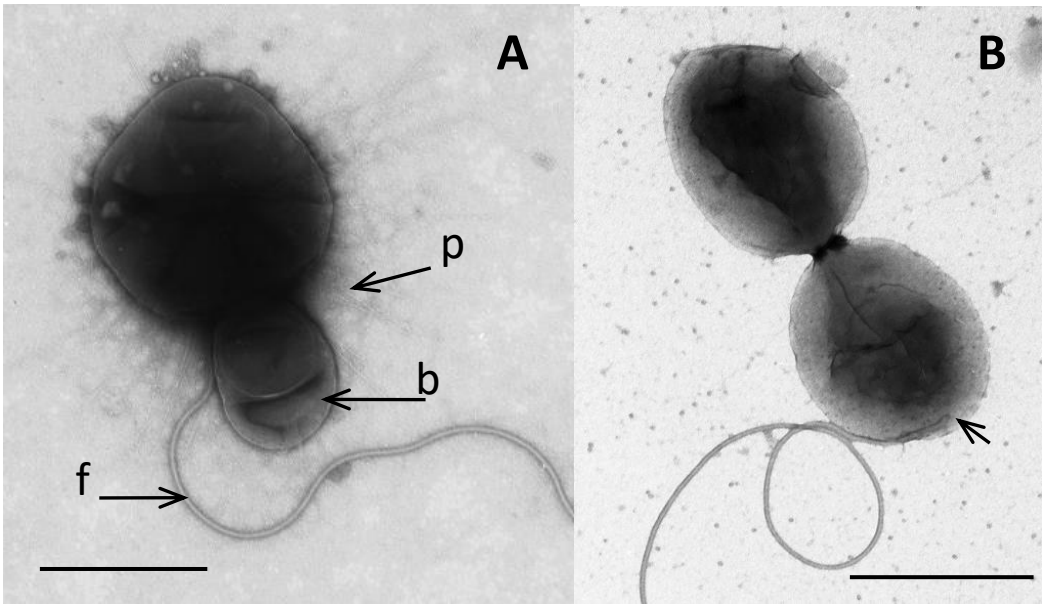

Рисунок 4. Электронная микрография негативно окрашенных клеток *Thermostilla marina* SVX8^T, показывающая морфологию почкующихся клеток. (A) Материнская клетка с пилями (щетинками) (p) и отпочковывающаяся клетка (b) со жгутиком (f). (B) Дочерняя клетка, выросшая до размеров материнской, стрелкой показано полярное положение жгутика у дочерней клетки; масштабная линейка, 0.5 мкм.

Таблица 3. Характеристика первых термофильных представителей филума *Planctomycetes*

Характеристика	*Thermogutta terrifontis* R1^T	*Thermogutta hypogea* SBP2^T	*Thermostilla marina* SVX8^T
Диапазон T роста, ^{o}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

1.1.3. Распространение новых органотрофных нитратвосстанавливающих бактерий

Для анализа микробного разнообразия в последнее время стали широко использоваться методы высокопроизводительного 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.

Tepidibacillus fermentans был выделен из подземного газохранилища (глубина 800-1000 м). Два других вида, *T. decaturensis* и *T. infernus,* были получены из подземного месторождения кварцевого песчаника (США) (глубина 1700м) и из самой глубокой в мире шахты Тау Тона (ЮАР) (глубина 3450 м). Близкородственные филотипы также были детектированы в подземных экосистемах: в стоках шахтных вод, в подземном водоносном слое, в загрязненных почвах на глубине до 12 м. Таким образом, род *Tepidibacillus,* вероятно, можно считать представителем глубинной биосферы. Кроме того, родственный филотип был обнаружен в микробной топливной ячейке, инокулированной сброженным илом из очистных сооружений. Местообитания представителей этого рода расположены на нескольких материках: в Евразии, Северной Америке и Африке.

Типовые штаммы видов рода *Thermogutta* были выделены из континентальной гидротермы и глубокой шахты. Родственные им филотипы, представленные в базе данных GenBank, были детектированы, главным образом, в наземных гидротермах и системах очистки сточных вод. Довольно широкий диапазон pH роста представителей *Thermogutta* позволяет им адаптироваться к различным внешним условиям, о чем может свидетельствовать выявление их как в нейтральных, так и в щелочных наземных горячих источниках. Филотипы, которые можно отнести к роду

Thermogutta, были обнаружены в различных регионах, в том числе в Италии, Папуа Новой Гвинее, России, США, ЮАР и Японии.

Из приведенных данных видно, что подземные биотопы и системы очистки сточных вод являются местообитаниями, общими для представителей родов *Tepidibacillus* и *Thermogutta*. Эти организмы могут входить в микробные сообщества, развивающиеся в характерных для таких экосистем биопленках, где клетки связаны внеклеточным полимерным матриксом. В состав матрикса входят экзополисахариды, ДНК и белки, которые, как и продукты разложения биомассы, могут служить субстратами для бактерий родов *Tepidibacillus* и *Thermogutta*. О развитии в виде биопленок свидетельствует и склонность *Thermogutta* к образованию больших агрегатов.

В базе GenBank 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.

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

1.2. ЛИТОАВТОТРОФНЫЕ СЕРООКИСЛЯЮЩИЕ НИТРАТРЕДУКТОРЫ

1.2.1. Выделение и характеристика новых термофильных литоавтотрофных сероокисляющих нитратвосстанавливающих бактерий

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. Филогенетический анализ на основе гена 16S рРНК полученных чистых культур (Таблица 4) выявил, что две бактерии (штаммы S2479^T и ST65^T) являются представителями новых родов, относящихся к порядкам

Таблица 4. Получение чистых культур литотрофных сероокисляющих нитратвосстанавливающих бактерий

Место отбора пробы	Условия культивирования		Чистая культура ,штамм	Ближайший родственный организм / порядок	Сходство генов 16S рРНК (%)
	T°C	Соленость среды			
Кунашир, Горячий пляж, севернее мыса Горячий	65	Морская	**S2479**	***Thioalcalivibrio denitrificans / Chromatiales***	**92.26**
Кунашир, Горячий пляж, севернее мыса Горячий	65	Морская	2488	*Hydrogenivirga caldilitoris / Aquificales*	99.1
Кунашир, Нескученские источники, мелководная гидротерма	65	Морская	378	*Thermosulfurimonasdismutans / Thermodesulfobacteriales*	97.9
Кунашир, Нескученские источники, мелководная гидротерма	65	Морская	S38	*Hydrogenivirga okinawensis / Aquificales*	99.3
Кунашир, Нескученские источники, источник Белый ключ	65	Пресная	328	*Hydrogenobacter subterraneus / Aquificales*	99.3
Камчатка, кальдера Узон, ручей Термофильный	65	Пресная	76	*Caldimicrobium rimae / Thermodesulfobacteriales*	99.6
Спрединговый центр Лау, поле Маринер, Тихий океан	50	Морская	Mar	*Thioprofundum hispidum / Chromatiales*	99.4
Спрединговый центр Лау, поле Маринер, Тихий океан	65	Морская	443	*Persephonella hydrogeniphila / Aquificales*	97.2
Спрединговый центр Лау, поле Туи Малила, Тихий океан	**65**	**Морская**	**ST65**	***Thermosulfurimonas dismutans / Thermodesulfobacteriales***	**89.5**

Chromatiales (класс *Gammaproteobacteria*) и *Thermodesulfobacteriales*, со сходством генов 16S рРНК с ближайшими родственными организмами 90-92%. Остальные штаммы принадлежали порядкам *Aquificales, Chromatiales* и *Thermodesulfobacteriales* со сходством генов 16S рРНК с ближайшими родственными организмами 97.2-99.7%.

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.

К началу нашей работы большинство анаэробных сероокисляющх прокариот составляли мезофильные бактерии, принадлежащие филуму *Proteobacteria*. Среди термофилов было известно менее 10 видов, способных к анаэробному окислению элементной серы с нитратом: представители филума *Aquificae*, 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, *Inmirania thermothiophila* S2479^{T}, растущий при температурах до 68^{o}C, относится к классу *Gammaproteobacteria*, подавляющее большинство которого составляют мезофилы. Выделенная нами бактерия имеет самый высокий температурный оптимум и максимум роста среди анаэробных гаммапротеобактерий. Второй микроорганизм, *Thermosulfuriphilus ammonigenes* 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 способность восстанавливать нитрат, ранее показаны не были.

Основные характеристики типовых видов микроорганизмов, представляющих собой новые таксоны, приведены в Таблице 5. Обе бактерии имеют клетки палочковидной формы, неподвижные или с полярным жгутиком и грамотрицательным типом клеточной стенки, спор не образуют (Рисунки 5 и 6.). Оба штамма являются нейтрофилами и истинными термофилами с $T_{опт}$ 65^{o}C. *I. thermothiophila* выделена из гидротермы, расположенной в приливной зоне, где контакт с морской водой носит периодический характер; как следствие, ей нужна менее низкая соленость среды, чем штамму *T. ammonigenes*, выделенному из глубоководной гидротермы. Обе бактерии способны к литоавтотрофному росту с окислением серы и восстановлением нитрата. *T. ammonigenes* также способен диспропорционировать элементную серу и тиосульфат. *I. thermothiophila* может

использовать водород и органические вещества как альтернативные доноры электронов и расти микроаэробно. Эти микроорганизмы используют разные биохимические пути для восстановления нитрата, что приводит к образованию различных конечных продуктов метаболизма (Таблица 5).

Таблица 5. Таксономическое положение и основные характеристики новых литоавтотрофных сероокисляющих нитратвосстанавливающих бактерий

Характеристика	*Inmirania thermothiophila* S2479^T gen. nov. sp. nov.	*Thermosulfuriphilus ammonigenes* ST65^T gen. nov. sp. nov.
Таксономическое положение*	*Proteobacteria - Gammaproteobacteria – Chromatiales - Ectothiorhodospiraceae*	*Thermodesulfobacteria – Thermodesulfobacteria – Thermodesulfobacteriales – Thermodesulfobacteriaceae*
Местообитание	Гидротерма в приливной зоне горячего пляжа, о. Кунашир, Курильские острова (Россия)	Глубоководная гидротермальная постройка (Tui Malila) спрединговый центр Восточное Лау, Тихий океан
Морфология	Подвижные прямые или слегка изогнутые палочки 0.6-0.7 мкм толщиной и 1.0-2.0 мкм длиной.	Неподвижные прямые или слегка изогнутые палочки 0.5- 0.6 мкм толщиной и 0.8-1.5 мкм длиной
Тип клеточной стенки	Грамотрицательный	Грамотрицательный
Т роста,^{o}С Мин-опт-макс	35-65-68	47-65-75
pH роста Мин-опт-макс	5.5-6.5-8.8	5.5-6.5-7.5
Концентрация NaCl, % (вес/об.) Мин-(опт)-макс	0.5-(1.5-2.0)-3.5	1.5-(2.0-2.5)-4.5
Доноры электронов	S^0, $S_2O_3^{2-}$, H_2, ацетат, формиат, пропионат, бутират, лактат, малат, пируват, сукцинат, пептон и дрожжевой экстракт	S^0, $S_2O_3^{2-}$
Акцепторы электронов	NO_3^-, O_2	NO_3^-
Продукт восстановления NO_3^-	N_2	NH_4^+
Метаболизм	Литоавтотрофный рост с S^0 и NO_3^-. Факультативный анаэроб, микроаэрофил. Дыхание	Облигатный литоавтотроф, рост с S^0 и NO_3^-. Строгий анаэроб. Дыхание Диспропорционирование серы.

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

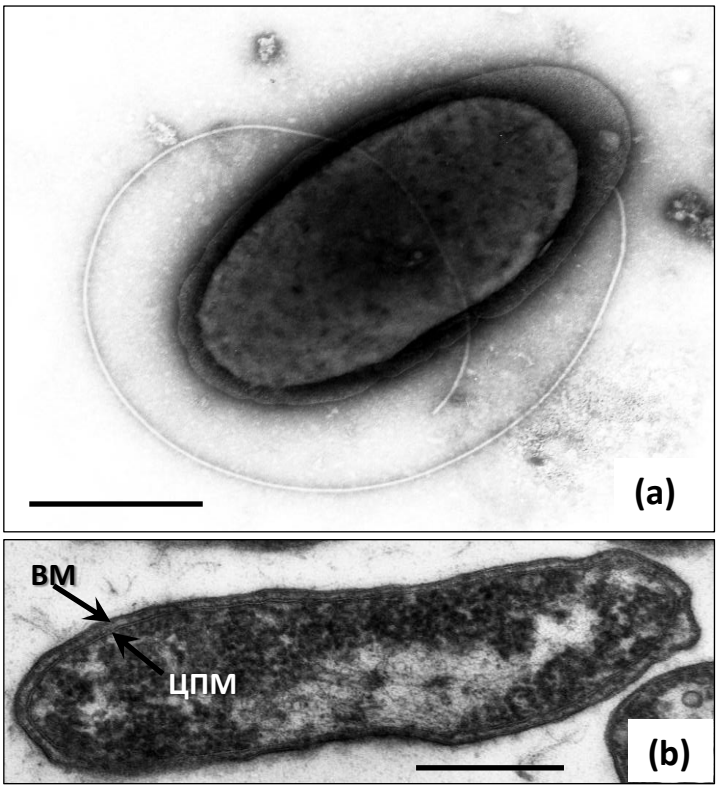

Рисунок 5. Морфология клеток *Inmirania thermothiophila* S2479^{T}. (a) Электронная микрография негативно окрашенных клеток штамма, показывающая морфологию клетки и положение жгутика; (b) Ультратонкий срез, показывающий строение клеточной стенки. ЦПМ, цитоплазматическая мембрана, ВМ, внешняя мембрана. Масштабная линейка, 0.5 мкм

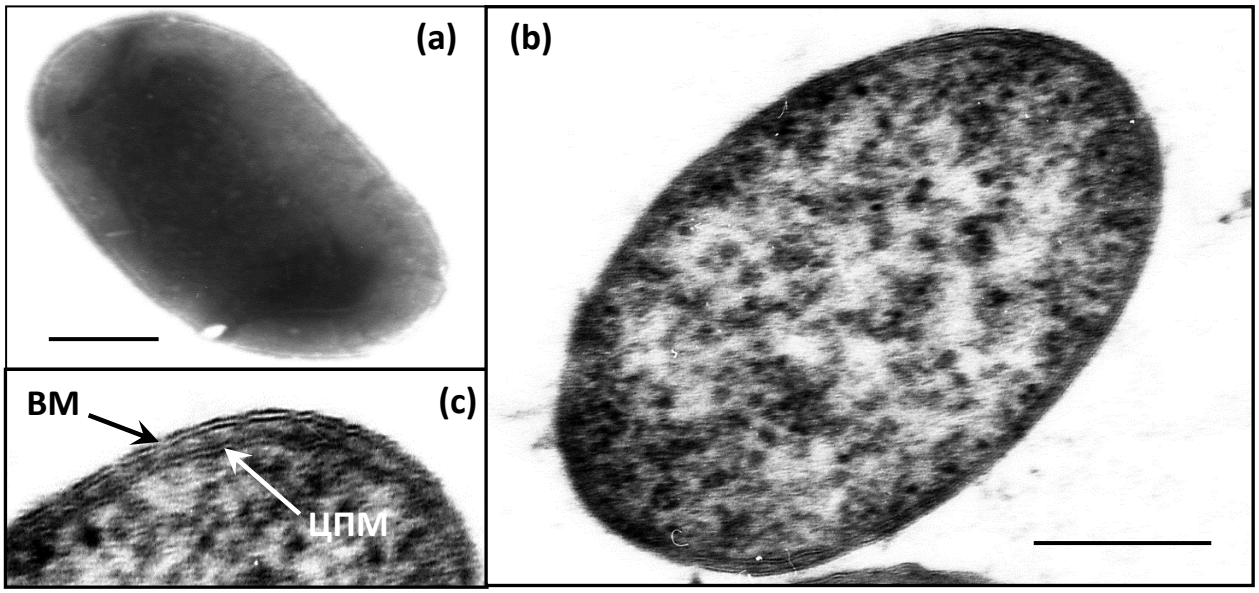

Рисунок 6. Морфология клеток *Thermosulfuriphilus ammonigenes* ST65^{T}.(a) Электронная микрография негативно окрашенных клеток штамма, показывающая морфологию клетки, масштабная линейка, 0.2 мкм; (b) Ультратонкий срез, показывающий строение клеточной стенки, бар 0.2 мкм; (c) увеличенное изображение, показывающее ультраструктуру с цитоплазматической мембраной(ЦПМ) и внешней мембраной (ВМ); масштабная линейка, 0.1 мкм.

1.2.2. Диссимиляционная аммонификация нитрата, связанная 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 & Dalsgaard, 2008; Shao et al., 2010). Аммонификация нитрата с сульфидом в качестве донора электронов продемонстрирована для нескольких видов *Proteobacteria* (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 элементной серы и восстановлением нитрата до аммония, к началу нашей работы были неизвестны.

Штамм *T. ammonigenes* ST65^T был выделен на среде, содержащей серу и нитрат в качестве донора и акцептора электронов, и рос с образованием сульфата и аммония. Наиболее филогенетически близкородственными ему организмами оказались *Thermosulfurimonas dismutans* S95^T (филум *Thermodesulfobacteria*, 89.5% сходства) и *Dissulfuribacter thermophilus* S69^T (класс *Deltaproteobacteria*, 87.4% сходства), описанные ранее как диспропорционирующие серу и ее соединения (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 7). Конечная концентрация клеток достигала 1.7-2.1x10^8 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. 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

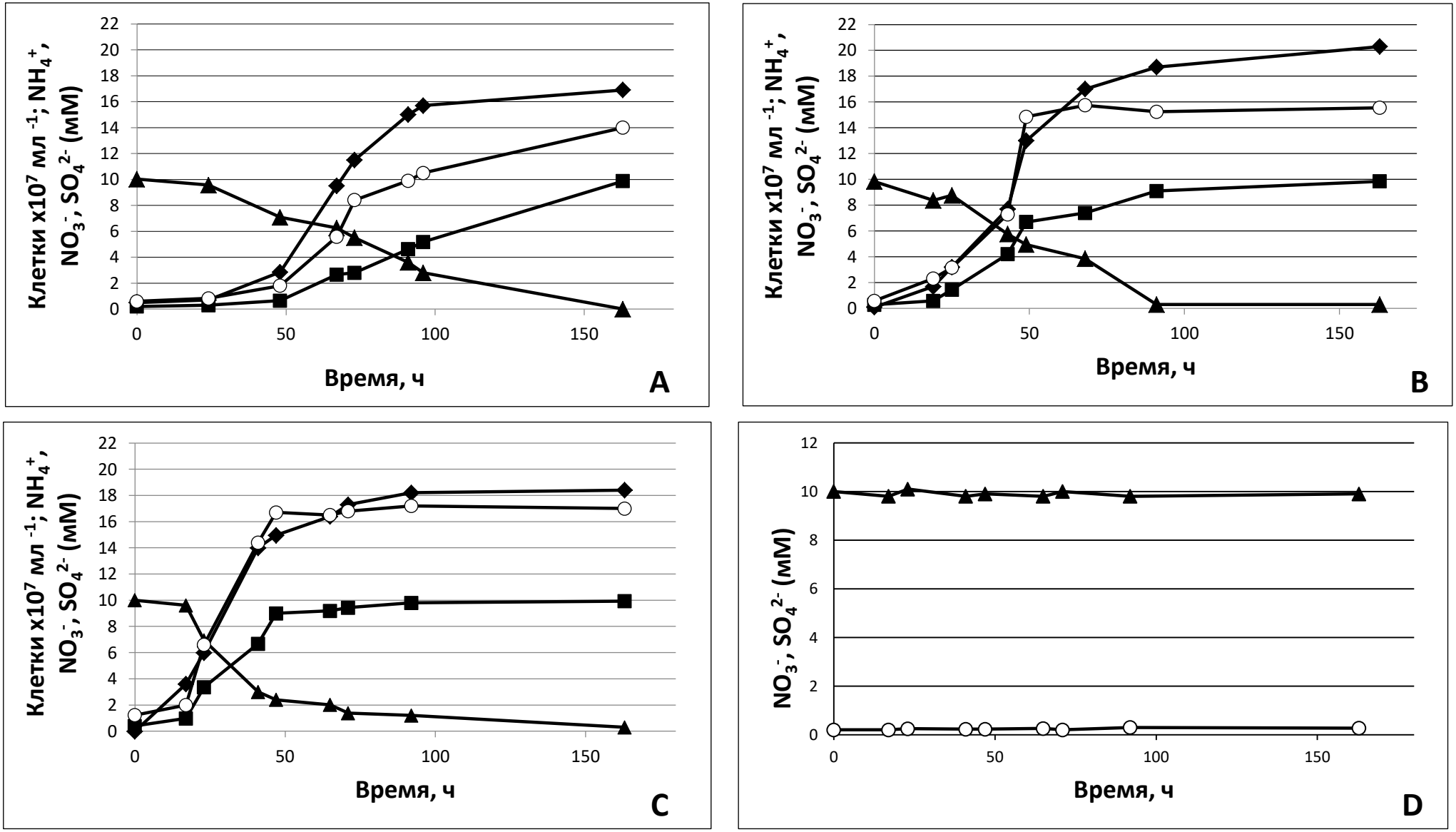

Рисунок 7. Рост *T. ammonigenes* ST65^T (A), *T. dismutans* S95^T (B) и *D. thermophilus* S69^T (C) в среде с элементной серой и нитратом. (D), неинокулированный контроль. (♦) концентрация клеток (x10^7/мл); концентрации (мМ) нитрата (▲), сульфата (○) и аммония (■).

энергетическом метаболизме всех трех микроорганизмов в данных условиях. Отношение образованного сульфата к потребленному нитрату составило 1.3-1.5. Такое отношение SO_4^{2-}/NO_3^- близко к теоретическому отношению, согласно реакции:

$4S^0 + 3NO_3^- + 7H_2O = 4SO_4^{2-} + 3NH_4^+ + 2H^+$

$[SO_4^{2-}/NO_3^- = 1.33]$.

Анализ полноразмерных геномных последовательностей *T. dismutans* и *D. thermophilus* показал, что в обоих организмах присутствуют гены (*napMADGH*), кодирующие комплекс нитрат-восстанавливающих белков Nap типа. У обоих организмов в этот комплекс входят периплазматические тетрагемовый цитохром NapM и каталитическая субъединица NapA, а также цитоплазматический шаперон NapD. Нитратвосстанавливающий комплекс *T. dismutans* и *D. thermophilus* не содержит цитохрома NapC для переноса электронов, а имеет NapGH комплекс, состоящий из двух Fe/S белков, аналогично некоторым эпсилонпротеобактериям,например, *Wolinella succinogenes* (Kern & Simon, 2009). Дигемовый цитохром NapB у этих бактерий также отсутствует. Каким образом происходит дальнейшее восстановление образованного нитрита в аммоний не вполне ясно, поскольку в геномах обоих организмов не обнаружены гомологи ключевого фермента канонической аммоний-образующей нитритредуктазы – пентагемовой цитохром с редуктазы, NrfA.

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. Причина, по которой микроорганизмы используют аммонификацию вместо энергетически более выгодной денитрификации, неясна. Возможным объяснением может быть то, что при аммонификации используется меньше нитрата, что может давать преимущества в экосистемах с более низким его содержанием (Yoon et al., 2015). 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.

Таким образом, в ходе исследования биоразнообразия литоавтотрофных анаэробных микроорганизмов, растущих в анаэробных условиях с окислением серы и восстановлением нитрата, были получены бактерии, 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 *Gammaproteobacteria.*

2. НОВЫЕ ТЕРМОФИЛЬНЫЕ СУЛЬФИТВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ БАКТЕРИИ

Диссимиляционное восстановление серных соединений рассматривается как один из наиболее ранних энергодающих процессов, возникших у прокариот (Canfield et al., 2006). Газовые флюиды многих современных вулканических систем содержат значительные количества сернистого газа (SO_2). Из-за высокой растворимости, сернистый ангидрид в водных растворах присутствует в виде сульфит-иона. К прокариотам, осуществляющим диссимиляционную сульфитредукцию, относятся почти все сульфатредукторы. Среди неспособных к восстановлению сульфата микроорганизмов известно всего несколько видов литоавтотрофных термофильных сульфитредукторов, и все они могут использовать также и альтернативные сульфиту акцепторы электронов (Aguiar et al., 2004; Yoneda et al., 2013; Huber et al., 1987, 1997).

2.1. Выделение и характеристика новых термофильных литоавтотрофных сульфитвосстанавливающих бактерий

Для выделения анаэробных термофильных литоавтотрофных сульфитвосстанавливающих микроорганизмов использовали пробы осадка, воды и обрастаний, отобранных из наземных и мелководных морских гидротерм Кунашира и Камчатки. Семь микроорганизмов были выделены в чистые культуры (Таблица 6).

Филогенетический анализ на основе гена 16S рРНК выявил, что две полученные бактерии (штаммы SH388^T и SF97^T) 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%. Остальные чистые культуры представляли новые штаммы ранее описанных видов бактерий, принадлежащих родам *Ammonifex* (три из пяти штаммов), *Carboxydothermus* и *Caldimicrobium* с уровнем сходства генов 16S рРНК с ближайшими родственными организмами 99.3-99.7%. Типовые штаммы видов *Ammonifex degensii, A. thiophilus, Carboxydothermus pertinax* и *Caldimicrobium rimae* не используют сульфит в качестве акцептора электронов для роста, хотя могут использовать различные соединения серы.

Таблица 6. Получение чистых культур литоавтотрофных сульфитвосстанавливающих бактерий

Место отбора проб	Условия культивирования		Чистая культура, штамм	Ближайший родственный организм/ порядок	Сходство генов 16S рРНК (%)
	T°C	Соленость среды			
Кунашир, Нескученские источники, мелководная гидротерма	**50**	**Морская**	**SH388**	***Dissulfuribacter thermophiles / class Deltaproteobacteria***	**91.6**
Кунашир, Нескученские источники, мелководная гидротерма	65	Морская	H384	*Caldimicrobium rimae / Thermodesulfobacteriales*	99.4
Кунашир, кальдера Головнина, оз. Кипящее	65	Пресная	82	*Ammonifex degensii / Thermoanaerobacterales*	99.3
Кунашир, кальдера Головнина, оз. Кипящее	**65**	**Пресная**	**SF97**	***Ammonifex thiophilus / Thermoanaerobacterales***	**93.1**
Кунашир, кальдера Головнина, оз. Кипящее	65	Пресная	184	*Ammonifex degensii / Thermoanaerobacterales*	99.3
Камчатка, Дачные источники, активная площадка, в. Мутновский	65	Пресная	M4	*Carboxydothermus pertinax / Thermoanaerobacterales*	99.7
Камчатка, Дачные источники, активная площадка, в. Мутновский	65	Пресная	M9	*Ammonifex thiophilus / Thermoanaerobacterales*	99.4

Нами были выделены, описаны и узаконены как новые таксоны два штамма термофильных литоавтотрофных бактерий, способных расти за счет восстановления сульфита водородом (Таблица 7).

Таблица 7. Таксономическое положение и основные характеристики новых литоавтотрофных сульфитвосстанавливающих бактерий

Организм / Характеристика	*Dissulfurirhabdus thermomarina* SH388^T gen. nov., sp. nov.	*Thermodesulfitimonas autotrophica* SF97^T gen. nov., sp. nov.
Таксономическое положение	*Proteobacteria - Deltaproteobacteria*	*Firmicutes – Clostridia- Thermoanaerobacterales - Thermoanaerobacteraceae*
Местообитание	Мелководная морская гидротерма, о. Кунашир, Курильские острова, Россия	Горячий источник, кальдера Головнина, о. Кунашир, Курильские острова, Россия
Морфология	Подвижные прямые палочки 0.2-0.4 мкм толщиной и 1.0-2.5 мкм в длину. Полярный жгутик.	Подвижные прямые палочки 0.5-0.6 мкм толщиной и 1.0-2.0 мкм в длину. Латеральные жгутики.
Тип клеточной стенки	Грамотрицательный	Грамположительный
Т роста,^{o}C Мин-опт-макс	25-50-58	45-65-72
pH роста Мин-опт-макс	5.0-(6.0-6.5)-7.5	5.5-(6.0-6.5)-8.5
Концентрация NaCl, % (вес/об.) Мин-(опт)-макс	0.5-(2.0-2.5)-4.0	0-(0)-1.0
Доноры электронов	H_2	H_2, формиат
Акцепторы электронов	SO_3^{2-}	SO_3^{2-}
Метаболизм	Облигатный литоавтотроф. Строгий анаэроб. Рост за счет восстановления или диспропорционирования соединений серы	Литоавторофный рост с водородом и сульфитом. Строгий анаэроб. Облигатный сульфитредуктор.

Оба штамма являются нейтрофилами. *Dissulfurirhabdus thermomarina* SH388^T - умеренный термофил с оптимумом температуры роста около 50^{o}C, *Thermodesulfitimonas autotrophica* SF97^T термофил с $T_{опт}$ 65^{o}C. Оба организма являются строгими анаэробами. Штамм SH388^T может расти и без добавления водорода, за счет диспропорционирования сульфита или элементной серы, и является первым диспропорционатором соединений серы, выделенным из мелководной гидротермальной экосистемы. Другой штамм, SF97^T, оказался способен к росту исключительно за счёт восстановления сульфита и не использовал другие акцепторы электронов. Таким образом, штамм *Thermodesulfitimonas autotrophica* SF97^T является

первым облигатным сульфитвосстанавливающим микроорганизмом. Оба организма используют серу и ее соединения в качестве акцептора электронов и участвуют в восстановительной части цикла серы, *Dissulfurirhabdus thermomarina* участвует также и в окислительной части.

Клетки обеих бактерий имеют палочковидную форму, спор не образуют. Клетки подвижные, с одним полярным жгутиком или с латеральным жгутикованием (Рисунки 8 и 9).

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 сульфитредуктор.

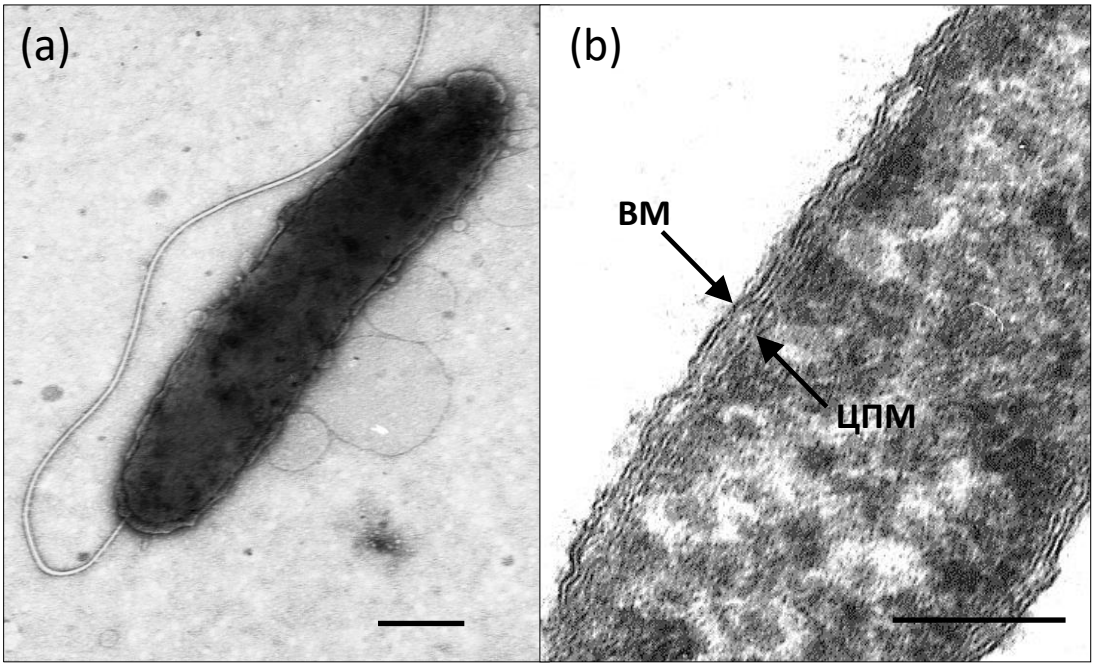

Рисунок 8. Морфология клетки *Dissulfurirhabdus thermomarina* SH388^T.(a) Электронная микрография негативно окрашенных клеток штамма, показывающая морфологию клетки и положение жгутика; (b) Ультратонкий срез, показывающий строение клеточной стенки. ЦПМ, цитоплазматическая мембрана, ВМ, внешняя мембрана. Масштабная линейка, 0.2 мкм.

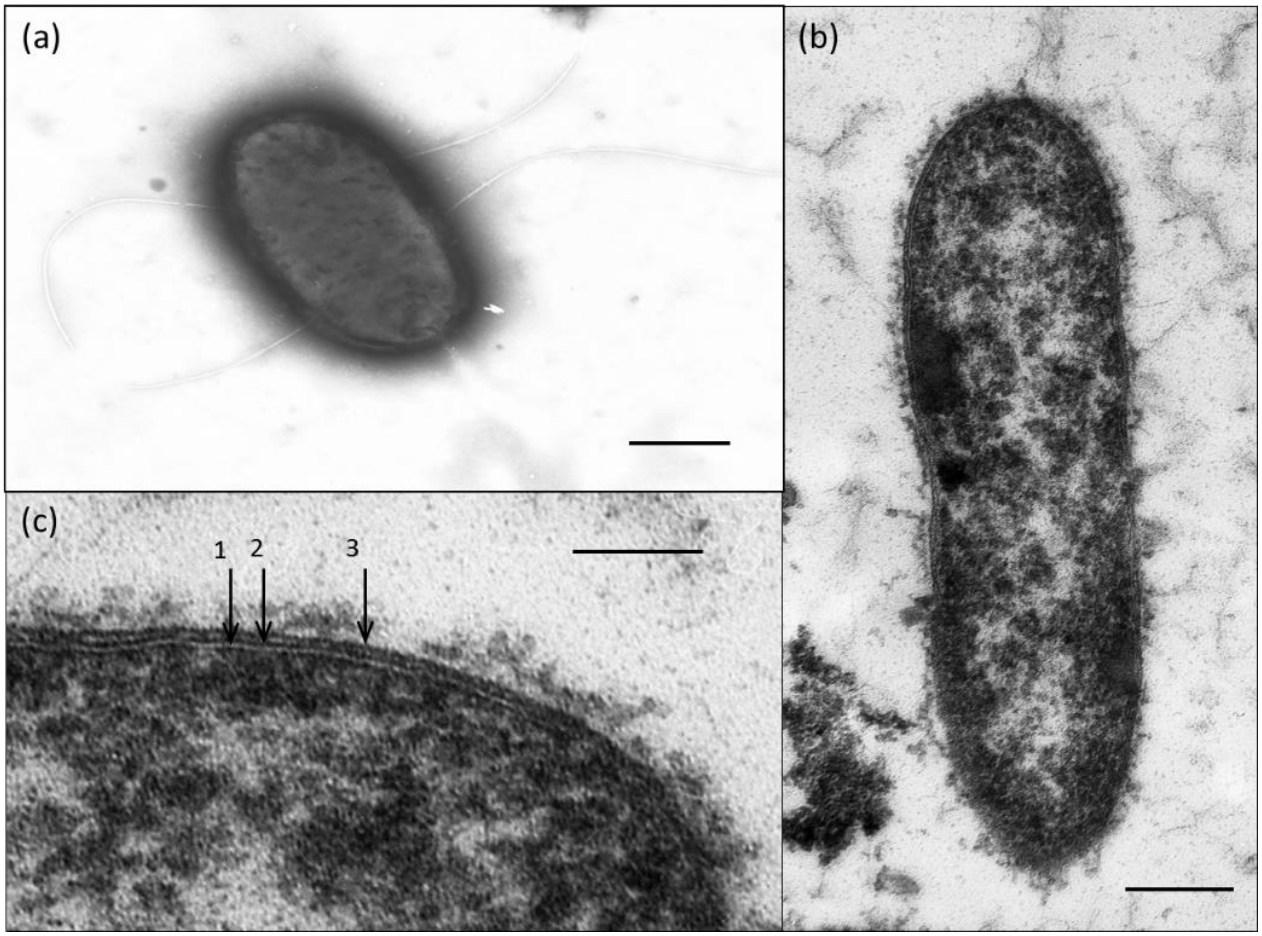

Рисунок 9. Морфология клетки *Thermodesulfitimonas autotrophica* SF97^{T}.(a) Электронная микрография негативно окрашенных клеток штамма, показывающая морфологию клетки и положение жгутиков; (b) Ультратонкий срез, показывающий строение клеточной стенки. Масштабная линейка, 0.3 мкм. (c) увеличенное изображение (b), показывающее ультраструктуру клеточной стенки с цитоплазматической мембраной (1), электронплотным слоем, прилегающим к мембране, (2) и внешним слоем клеточной стенки (3). Масштабная линейка, 0.1 мкм.

3. НОВЫЕ ТЕРМОФИЛЬНЫЕ ЖЕЛЕЗОВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ ПРОКАРИОТЫ

Диссимиляционное восстановление Fe(III) – один из наиболее значимых микробных процессов в современной биосфере. Оно также рассматривается как один из возможных наиболее ранних типов микробного метаболизма, обеспечивавшего окисление основного количества органического вещества в Архее (Walker, 1987; Nealson & Saffarini, 1994; Lovely et al., 2004). Железоредукторы были обнаружены во всех известных типах природных термальных экосистем, включая наземные и морские гидротермы, а также подземные геотермально нагреваемые воды и

осадочные породы (Lovely et al., 2004; Слободкин, 2005). В настоящее время описано около 80 видов термофильных прокариот, восстанавливающих Fe(III), некоторые из них способны также восстанавливать и Mn(IV).

3.1. Выделение и характеристика новых термофильных прокариот, способных восстанавливать железо

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. ДГГЭ-анализ устойчивых металлвосстанавливающих культур, полученных из наземных гидротерм, показал, что большинство в них составляли микроорганизмы, для которых эта способность была показана ранее, включая бактерии родов *Carboxydothermus*, *Thermoanaerobacter*, *Thermolithobacter, Thermovenabulum, Thermotoga*, *Thermincola* и кренархеоту рода *Pyrobaculum*. Кроме них, практически во всех культурах были детектированы бактерии, родственные видам рода *Carboxydocella*, для которых способность восстанавливать марганец ранее была неизвестна. В устойчивых железовосстанавливающих накопительных культурах из морских глубоководных гидротерм были детектированы археи семейств *Thermococcaceae* и *Archaeoglobaceae* и бактерии классов *Deferribacteres*, *Thermotogae* и *Deltaproteobacteria*. Железоредукторы известны среди представителей всех этих таксонов. Кроме железовосстанавливающих бактерий были выделены члены семейства *Thermaceae*, не способные восстанавливать Fe(III).

Пять штаммов термофильных железовосстанавливающих прокариот, выделенных из наземных горячих источников и морских глубоководных гидротерм, были описаны и узаконены как новые таксоны (Таблица 8).

Таблица 8. Таксономическое положение и местообитания новых железоредукторов

Организм, статус	Таксономическое положение*	Местообитание
Pyrobaculum ferrireducens sp. nov.	*Crenarchaeota-Thermoprotei-Thermoproteales-Thermoproteaceae*	Гидротермальный источник, кальдера Узон, Камчатка
Carboxydocella manganica sp. nov.	*Firmicutes-Clostridia-Clostridiales*	Гидротермальный источник, кальдера Узон, Камчатка
Geoglobus acetivorans sp. nov.	*Euryarchaeota-Archaeoglobi-Archaeglobales-Archaeglobaceae*	Глубоководная гидротермальная постройка (Ашадзе) Срединно-Атлантический хребет
Deferribacter autotrophicus sp. nov.	*Deferribacteres-Deferribacteres-Deferribacterales-Deferribacteraceae*	Глубоководная гидротермальная постройка (Ашадзе) Срединно-Атлантический хребет
Deferrisoma camini gen. nov. sp. nov.	*Proteobacteria-Deltaproteobacteria*	Глубоководная гидротермальная постройка (ABE) спрединговый центр Восточное Лау, Тихий океан

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

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 abyssii* (Kashefi et al., 2003; Miroshnichenko et al., 2003) и тремя видами *Archaea* - *Thermococcus* sp. SN531, *Geoglobus ahangari* и *'Aciduliprofundum boonei'* (Slobodkin et al., 2001; Kashefi et al., 2002; Reysenbach et al., 2006). Нами был выделен новый вид гипертермофильных архей, а также два новых вида бактерий, один из которых представляет и новый род.

Основные характеристики типовых видов микроорганизмов, представляющих собой новые таксоны, приведены в Таблице 9. Клетки *Geoglobus acetivorans* имеют коккоидную форму, клетки остальных изолятов представляют собой палочки различного размера (Рисунок 10). *Deferrisoma camini* – умеренный термофил с температурным оптимумом около 50^{o}C, *Deferribacter autotrophicus* и *Carboxydocella manganica* - термофилы с оптимумом температуры роста 60^{o}C, *Geoglobus acetivorans* и *Pyrobaculum ferrireducens* являются гипертермофильными археями. Все организмы имеют оптимум pH в диапазоне 6.0-7.0, т.е. являются нейтрофильными. Требования к солености среды коррелируют с условиями в местах отбора проб.

Все выделенные организмы способны к анаэробному дыханию с Fe(III), сопряженному с окислением органических веществ. Железоредукция играет

Таблица 9. Морфологические, физиологические и метаболические характеристики новых железовосстанавливающих прокариот

Организм/ Свойство	*Pyrobaculum ferrireducens* 1860^{T}	*Carboxydocella manganica* SLM61^{T}	*Geoglobus acetivorans* SBH6^{T}	*Deferribacter autotrophicus* SL50^{T}	*Deferrisoma camini* S3R1^{T}
Морфология	Неподвижные прямые палочки	Подвижные палочки	Мелкие подвижные кокки	Подвижные палочки	Короткие подвижные палочки
Т роста, ^{o}C Мин-опт-макс	75-(90-95)-98	26-(58-60)-70	50-81-85	25-60-75	36-50-62
pH роста Мин-опт-макс	5.5-(6.0-7.0)-7.5	5.5-6.5-8.0	5.0-6.8-7.5	5.0-6.5-7.5	5.5-6.5-7.5
Концентрация NaCl, % вес./об. Мин-опт-макс	0-1.0	0-0.5-2.0	1.0-2.5-6.0	1.0-2.5-6.0	1.0-(2.0-2.5)-5.0
Доноры электронов/ субстраты	Сложные белковые соединения	H_2, формиат, органические кислоты, сахара, дрожжевой экстракт	H_2, ацетат, жирные и органические кислоты, белковые соединения	H_2, формиат, ацетат, органические кислоты, белковые соединения	Ацетат, жирные и органические кислоты, белковые соединения
Акцепторы электронов	Fe(III), NO_3^-, $S_2O_3^{2-}$, SeO_3^{2-}, SeO_4^{2-}, AsO_4^{2}	Mn(IV), Fe(III), NO_3^-	Fe(III)	Fe(III), Mn(IV), NO_3^- S^0	Fe(III), S^0
Метаболизм	Облигатный гетеротроф. Анаэробное дыхание.	Литоавтотрофный рост с H_2/ Fe(III). Анаэробное дыхание. Брожение.	Литоавтотрофный рост с H_2/ Fe(III). Анаэробное дыхание.	Литоавтотрофный рост с H_2/ Fe(III). Анаэробное дыхание.	Облигатный гетеротроф. Анаэробное дыхание.

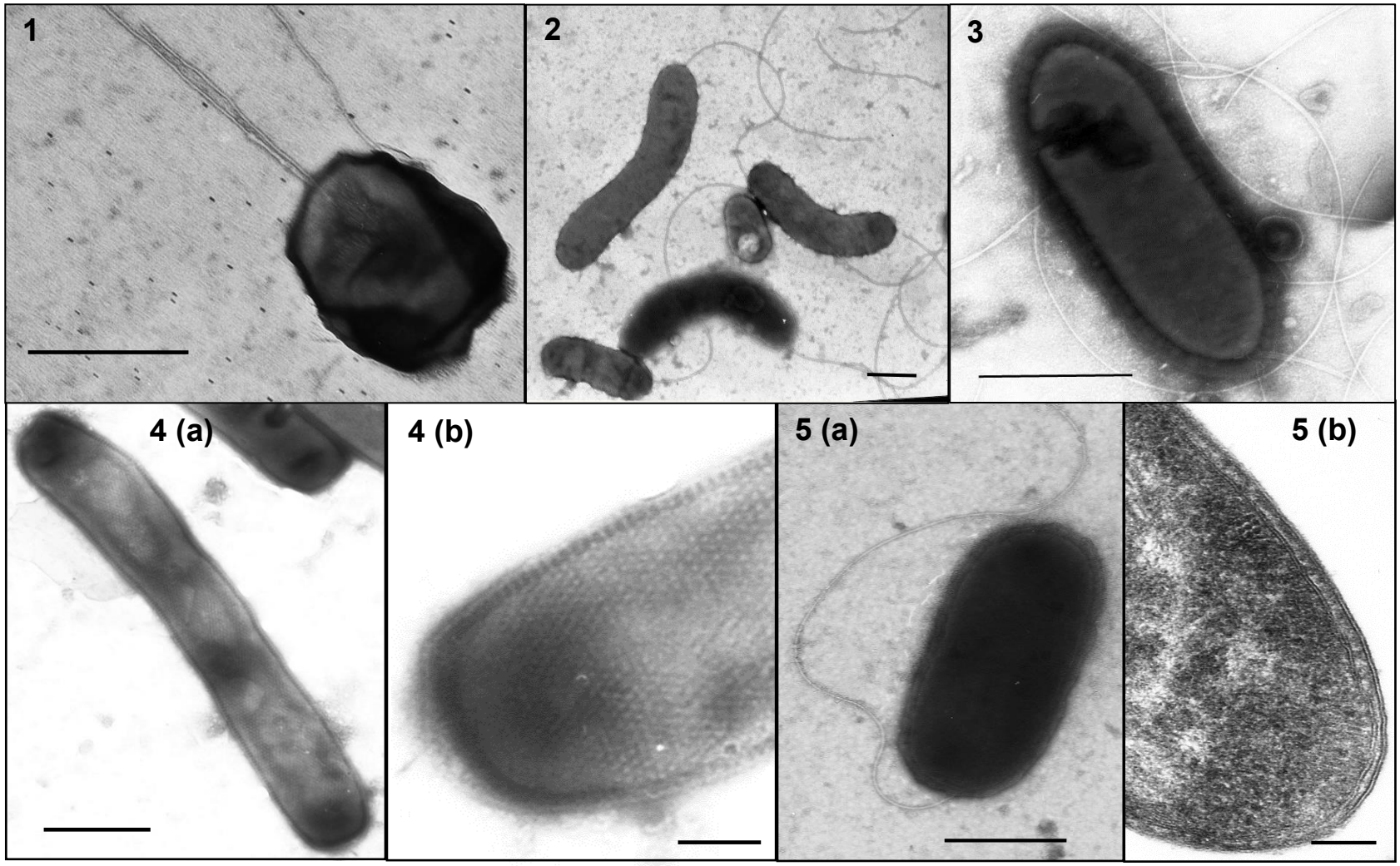

Рисунок 10. Электронная микрография негативно окрашенных клеток новых термофильных железоредукторов, показывающая морфологию клеток и положение жгутиков, 1, *Geoglobus acetivorans* SBH6^{T}; 2, *Deferribacter autotrophicus* SL50^{T}; 3, *Carboxydocella manganica* SLM61^{T}; 4(a), *Pyrobaculum ferrireducens* 1860^{T}; 5(a), *Deferrisoma camini* S3R1^{T}. Бар 0.5 мкм. 4(b), внешний слой поверхности клетки *Pyrobaculum ferrireducens* 1860^{T} (S-слой); 5(b), ультратонкий срез, показывающий строение клеточной стенки *Deferrisoma camini* S3R1^{T}. масштабная линейка, 0.1 мкм.

ключевую 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, значительно увеличивающим скорость роста и конечную концентрацию клеток. *Deferribacter autotrophicus* и *Carboxydocella manganica* могут использовать 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. *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 10). Как видно из результатов анализа, функции многих кодируемых белков пока не выяснены, особенно у представителей архей (более 30%). Способность к литоавтотрфному росту *Geoglobus acetivorans* и *Deferribacter autotrophicum* определяется наличием генов, кодирующих все ферменты пути Вуда-Льюнгдаля и восстановительного цикла трикарбоновых кислот, соответственно. Геном *Pyrobaculum ferrireducens* содержит гены характерного для анаэробных гипертермофильных *Crenarchaeota* дикарбоксилат/ 4-гидроксибутиратного пути фиксации углекислого газа (Berg, 2011), однако роста этого организма в авторофных условиях не наблюдалось. Облигатно органотрофная бактерия *Deferrisoma camini* не обладает генами, ответственными за фиксацию CO_2. 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 цитоплпзматической 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 выделенных нами организмов. Наибольшим количеством таких цитохромов, включая мультигемовые с числом гемов 21-30, обладает *Deferrisoma camini*.

Таблица 10. Общая характеристика геномов новых железоредукторов и предполагаемые детерминанты автотрофного роста и восстановления Fe(III)

Организм	*Geoglobus acetivorans* SBH6^T	*Pyrobaculum ferrireducens* 1860^T	*Deferribacter autotrophicum* SL50^T	*Deferrisoma camini* S3R1^T
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 c[§]	12	4	8	22
Количество Cys-Xaa-Xaa-Cys-His пептидных последовательностей				
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

3.3. Распространение новых железовосстанавливающих прокариот

Анализ последовательностей генов 16S рРНК в базе GenBank показал, что практически все близкородственные новым железоредукторам организмы получены из сходных экосистем, которые могут быть расположены как относительно близко, так и на значительном удалении. Так, все штаммы *Carboxydocella* выделены из горячих источников одного полуострова, Камчатки; а представители рода *Geoglobus*, как изоляты, так и некультивируемые, получены из глубоководных морских гидротерм, расположенных в двух разных океанах, Атлантическом и Тихом.

Известные виды *Deferribacter* выделены из глубоководных морских гидротерм или из морского шельфового нефтяного месторождения. Как следует из базы данных GenBank, местообитания близкородственных организмов также связаны с морскими гидротермами и месторождениями нефти и газа. География распространения весьма обширна и включает районы Срединно-Атлантического хребта, зоны Тихого океана у берегов Японии, нефтяные месторождения Дании и Великобритании в Северном море.

Типовой штамм *Deferrisoma camini* был выделен из глубоководной пробы, отобранной на гидротермальном поле спредингового центра Восточное Лау в Тихом океане. Второй описанный вид рода, *D. paleochoriense*, был получен из мелководной морской гидротермы Средиземного моря, у берегов острова Милос. Среди филотипов, имеющих сходство с типовым штаммом не ниже 95%, в базе данных содержится всего один, детектированный в горячих щелочных источниках (Папуа Новая Гвинея).

Представители гипертермофильного рода архей *Pyrobaculum*, в том числе некультивируемые, обитают преимущественно в наземных горячих источниках и сольфатарах, за исключением *P. aerophilum*, выделенного из мелководной морской гидротермы. Местообитания расположены в различных точках Земли, включая Исландию, юг Италии, США и Мексику, Дальний Восток России, Японию, Филиппины и Новую Зеландию.

Таким образом, в нашей работе были выделены и охарактеризованы новые таксоны термофильных железоредукторов. Среди них две гипертермофильные археи, *Geoglobus acetivorans* и *Pyrobaculum ferrireducens*. Гипертермофилы представляют уникальную группу микроорганизмов, растущих при температурах выше 80^{o}C и рассматриваются как наиболее древние формы жизни. *Geoglobus* - единственный род, состоящий из микроорганизмов, облигатно зависящих от железа. Железоредукция широко распространена среди представителей *Pyrobaculum*, и кроме того они могут использовать ряд альтернативных акцепторов, включая соединения серы, нитрат, селенат и арсенат. Способность к восстановлению селената и арсената у других гипертермофилов неизвестна. 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. Выделенный нами *Deferribacter autotrophicus* - первая морская глубоководная бактерия, способная к автотрофному росту за счет восстановления Fe(III). Для членов рода *Carboxydocella*

способность к восстановлению железа и марганца ранее показана не была. Все описанные ранее виды росли за счет гидрогеногенного окисления CO, тогда как полученный нами новый вид такой способностью не обладает. Таким образом, выделение нового вида *C. manganica* изменило представления о метаболизме представителей этого рода.

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. Результаты, 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 11).

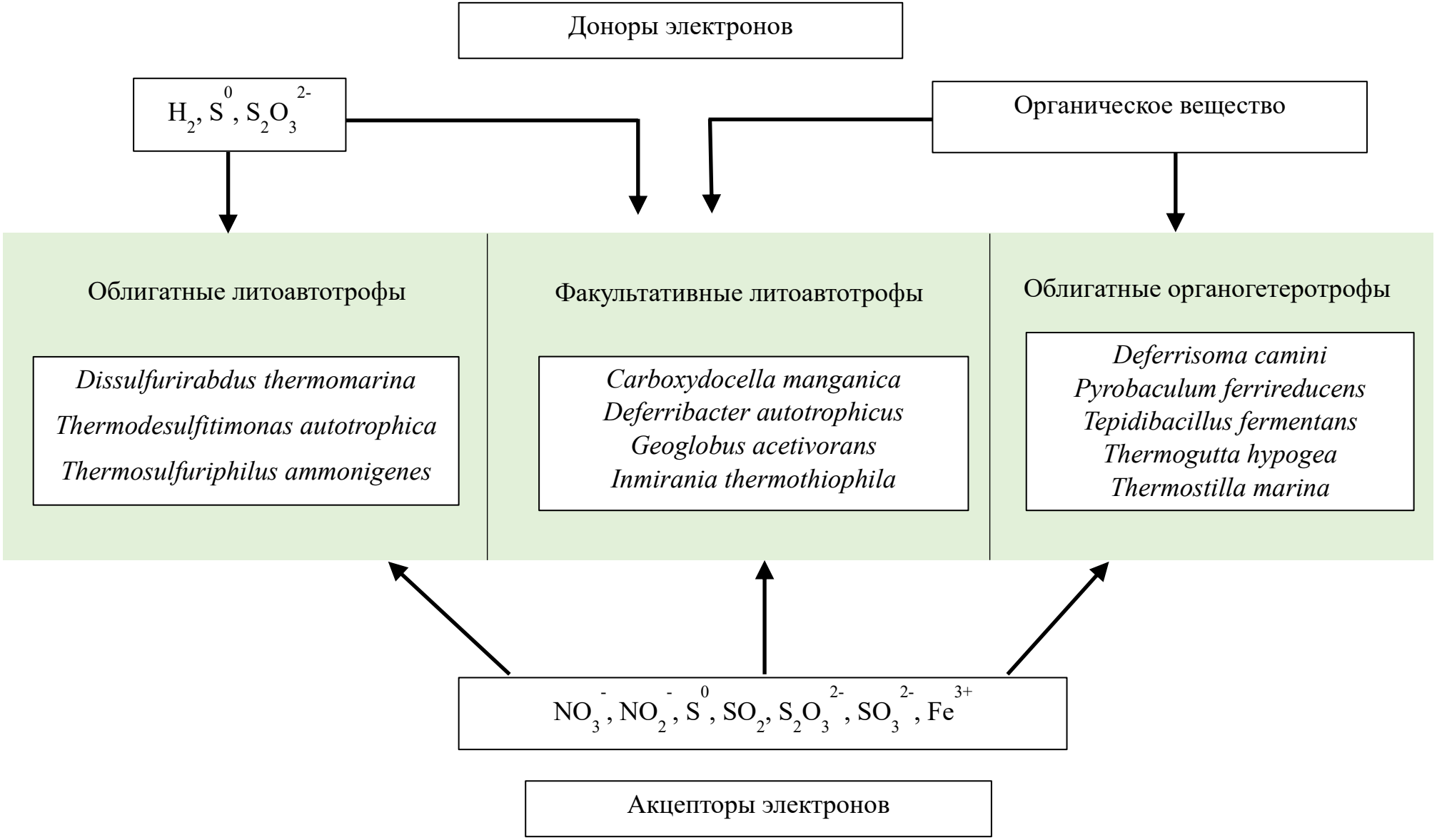

Рисунок 11. Новые термофильные прокариоты, использующие соединения азота, серы и железа в энергетическом метаболизме

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^{o}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 результаты 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.
6. 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.

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) Филогенентический 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., **Slododkina G.,** Slobodkin A., Beletsky A., Gavrilov S., Kublanov I., Bonch-Osmolovskaya E., Skryabin K., Ravin N. (2015) The genome of *Geoglobus acetivotans*: 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/ijs.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/ijs.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., Chernyh 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., Chernyh 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.**, Tarnovetckii 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 tepidiprofundi* 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. Nepomnyaschaya 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 Tthermophiles'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 *Planctomycetes* 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 *Planctomycetes.* // Abstracts of the EMBO Workshop *Planctomycetes-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.