*На правах рукописи*

**Лукина Анастасия Петровна**

# ВЫДЕЛЕНИЕ НОВЫХ СУЛЬФИДОГЕНОВ ИЗ ПОДЗЕМНЫХ ВОДОНОСНЫХ ГОРИЗОНТОВ

1.5.11. Микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**
**диссертации на соискание ученой степени**
**кандидата биологических наук**

**Москва - 2023**

Работа выполнена в лаборатории биохимии и молекулярной биологии при кафедре физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики Биологического института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет».

| | |
|---|---|
| **Научный руководитель**: | **Ольга Викторовна Карначук**<br>доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет» |
| **Официальные оппоненты:** | **Грабович Маргарита Юрьевна**<br>доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии и физиологии клетки Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет»<br>**Галушко Александр Сергеевич**<br>кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Агрофизический научно-исследовательский институт» |
| **Ведущая организация:** | **Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,** Биологический факультет |

Защита состоится «29» июня 2023 г в 13-00 на заседании диссертационного совета 24.1.233.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского по адресу: 117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2.

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

Автореферат разослан «____» _____ 2023 г.

| | |
|---|---|
| **Ученый секретарь диссертационного совета** | доктор биологических наук,<br>**Хижняк Татьяна Владимировна** |

# ОБЩАЯ ХАРАКТРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования**

Достижения в технологиях высокопроизводительного секвенирования, метагеномных и биоинформатических методах способствовали радикальному изменению наших взглядов на разнообразие микробной жизни (Hug et al., 2016). Тем не менее, заметное расширение геномной информации, которое привело к лучшему пониманию разнообразия бактерий и архей, контрастирует с нашей неспособностью культивировать представителей новых групп прокариот (Lewis et al., 2021). Большая часть наших знаний о прокариотах получена либо из меньшинства хорошо изученных культивируемых групп, либо из реконструированных геномов некультивируемых представителей (Castelle and Banfield, 2018). Культивирование необходимо для верификации полученных из геномов данных о клеточной биологии и физиологии микроорганизмов и для понимания их экологической роли. Без чистых культур или ко-культур (содержащих небольшое количество видов) трудно определить особенности клеточной биологии. Более того, межвидовые взаимодействия, эволюционные принципы, популяционная динамика и патогенность могут быть экспериментально подтверждены только при наличии культивируемых изолятов (Gutleben et al., 2017).

Термин «подземная биосфера» был предложен для обозначения части биосферы, находящейся ниже нескольких метров от поверхности Земли (Gold, 1992; Hoehler et al., 2013). Она простирается как минимум на 5 км вглубь на материковой части и на 10.5 км ниже морских и океанических осадков, что связано с предельными для жизни температурами, около 120 °C. По последним оценкам микроорганизмы глубинных экосистем составляют около 15% биомассы живых организмов на планете (Bar-On et al., 2018). Согласно другим оценкам, биомасса континентальных подповерхностных водоносных горизонтов составляет от 12 до 20% общей биомассы микроорганизмов на Земле (Magnabosco et al., 2018). Подповерхностные среды обитания на суше и в океане содержат множество функционально активных микробных сообществ, существование которых ограничено повышением температуры с глубиной (Teske, 2005; Itävaara et al., 2011; Lomstein et al., 2012; Bomberg et al., 2015). Наши знания о микроорганизмах глубинных экосистем остаются ограниченными из-за трудностей доступа к глубинным горизонтам. Отбор проб из них осложнен вследствие возможного загрязнения поверхностными микроорганизмами при бурении. Возможность изолировать и культивировать «глубинную» микробиоту путем применения стандартных методов также ограничена вследствие низкой численности микроорганизмов и их медленного роста (Colwell and D'Hondt, 2013).

Большинство исследований глубинной биосферы посвящено характеристике микробного разнообразия с использованием молекулярных методов и лишь отдельные исследования включают культивирование и

выделение чистых культур представителей глубинных экосистем. Западная Сибирь является удобным полигоном для исследования разнообразия и выделения микроорганизмов континентальных глубинных экосистем, что связано с активным бурением нефтепоисковых скважин, зачастую вскрывающих глубинные водоносные горизонты. Многие разведочные скважины функционируют до настоящего времени и их воды используют в бальнеологических целях. Часто подобные скважины являются артезианскими, а разгрузка глубинных вод под давлением исключает возможность загрязнения поверхностными микроорганизмами. Глубинные термальные скважины являются своеобразными «окнами» в подземный мир.

Сульфидогены, прежде всего, диссимиляционные сульфатредуцирующие прокариоты, являются одной из основных физиологических групп прокариот в глубинных термальных водоносных горизонтах (Boylan et al., 2019). Одной из важных проблем изучения микробиоты подземных водоносных горизонтов является культивирование загадочного представителя глубинной биосферы ‘*Candidatus* Desulforudis audaxviator’, обнаруженного в глубокой шахте по добыче золота в Южной Африке (Chivian et al., 2008). Геном бактерии был собран из метагенома сообщества, где ее доля составляла более 99 %. Анализ композитного генома показал, что основным метаболическим путем организма является гидрогенотрофная сульфатредукция. Все попытки культивировать ‘*Candidatus* Desulforudis audaxviator’ были безуспешными.

Микробные обрастания, образованные на устье термальных глубинных скважин, могут служить своеобразной «ловушкой» глубинных микроорганизмов, особенно спорообразующих *Firmicutes*. Другим перспективным подходом для культивирования может быть использование геномной и метагеномной информации для формулирования новых сред и подбора условий для роста. Все вышесказанное подтверждает актуальность разработки новых подходов для культивирования микроорганизмов «подземной биосферы» и выделения новых чистых культур из глубинных водоносных горизонтов.

**Цель и задачи исследования**

**Цель исследования**: выделение и изучение новых термофильных сульфидогенов из подземных водоносных горизонтов.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить накопительные и чистые культуры термофильных сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) из различных биотопов, вскрываемых глубинными скважинами.

2. Выделить чистую культуру ‘*Candidatus* Desulforudis audaxviator’ из водоносного горизонта нижнемеловых отложений, вскрываемых скважиной 1-Р, где она была обнаружена молекулярными методами, изучить морфологию и физиологию организма, оптимизировать среду для культивирования.

3. Изучить возможность использования микробных обрастаний, образующихся на изливе термальных скважин, для выделения микроорганизмов «подземной биосферы». Выделить чистые культуры термофильных спорообразующих сульфидогенов с использованием микробных матов в качестве инокулята.

4. Использовать данные композитных геномов о метаболизме и выделить новых термофилов, спутников сульфидогенов, представляющих минорный компонент сообщества воды глубинного горизонта нижнемеловых отложений, вскрываемых скважинами 1-Р и 5-Р.

**Научная новизна и теоретическая значимость работы**

В результате исследования выделены и охарактеризованы новые штаммы термофильных микроорганизмов из глубинных водоносных горизонтов, вскрываемых нефтепоисковыми скважинами в Западной Сибири.

Впервые получена чистая культура ранее некультивируемого '*Candidatus* Desulforudis audaxviator'. Оптимизированы условия и разработана среда для его культивирования.

С применением геномного и метагеномного подхода из воды подземного водоносного горизонта выделены чистые культуры термофильных спирохет, описанных нами как новый вид '*Longinema margulisiae*' sp. nov., новый род '*Longinema*' gen. nov. и новое семейство '*Longinemataceae*' fam. nov.

Впервые показано что, микробные обрастания, образующиеся на устьях глубинных скважин, могут быть эффективно использованы для выделения чистых культур спорообразующих прокариот из подземной биосферы. Из микробных обрастаний выделен представитель рода *Thermoanaerosceptrum,* филогенетически удаленный от известных представителей *Firmicutes*. Впервые показана способность к диссимиляционной сульфатредукции у рода *Thermoanaerosceptrum.*

**Практическая значимость**

Разработанные новые подходы к культивированию и выделению в чистую культуру, включая использование микробных обрастаний, развивающихся на устье глубинных скважин, могут быть использованы для выделения бактерий из глубинных подземных водоносных горизонтов. Применены геномный и метагеномный подходы для культивирования и выделения в чистую культуру минорных компонентов микробного сообщества подземных водоносных горизонтов. Показана возможность разработки, оптимизации среды и условий культивирования для термофильных бактерий глубинных водоносных горизонтов на основе геномных данных. Термофильные микроорганизмы глубинных водоносных горизонтов могут быть источником новых ферментов для биотехнологий.

**Личный вклад автора**

Автор принимал непосредственное участие на всех этапах работы, включая: отбор проб, культивирование и получение чистых культур бактерий из подземных биотопов, планирование и постановку экспериментов, статистическую обработку данных, анализ и оформление результатов, апробацию основных положений на различных конференциях и написание статей.

**Апробация работы**

Материалы диссертации были представлены на 2-м Российском Микробиологическом Конгрессе (г. Саранск, Россия, 2019), X и XII Международных конгрессах «Extremophiles» (Санкт-Петербург, Россия, 2014 и Искья, Италия, 2018), X и XI Молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, Россия, 2015 и 2016), Всероссийской молодежной конференции с международным участием «Биотехнология, биоинформатика и геномика растений и микроорганизмов» (Томск, 2016), Всероссийской научной конференции «Современная микробиология и биотехнология глазами молодых исследователей» (Томск, Россия, 2014).

**Публикации**

По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, из которых 6 экспериментальных статей, индексируемых в базах данных Web of Science / Scopus и 11 тезисов конференций различного уровня.

**Объем и структура работы**

Текст работы изложен на 114 страницах машинописного текста, содержит 23 рисунка и 7 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы содержит 148 наименований.

**Место выполнения работы и благодарности**

Работа выполнена в Лаборатории биохимии и молекулярной биологии при Кафедре физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики Биологического Института Томского Государственного Университета. Определение последовательностей геномов было проведено группой профессора Н.В. Равина из ФИЦ Биотехнологии РАН (Москва). Автор выражает признательность Ю.А. Франк, Л.Б. Глуховой, О.П. Иккерт и М.Р. Авакяну за практическую помощь и ценные рекомендации. Благодарность Н.В. Равину и сотрудникам его группы за проведение молекулярно-генетического анализа. Особую благодарность автор выражает научному руководителю О.В. Карначук за помощь в планировании и обсуждении результатов исследования.

**Финансовая поддержка**

Работа выполнена в рамках и при поддержке грантов РФФИ № 18-04-00181, № 18-34-00322 мол_а; РНФ № 14-14-00427, 18-14-00130 и 21-14-00114.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Обзор литературы**

Обзор литературы содержит 3 раздела, рассматривающие и обсуждающие подходы к культивированию некультивируемых микроорганизмов, микроорганизмов «подземной биосферы» и сульфидогенов в подземных водоносных горизонтах.

**Материалы и методы**

Для исследований были отобраны и изучены пробы глубинных термальных вод мезозойских отложений, вскрываемых скважинами 1-Р в поселке Белый Яр и 5-Р в селе Чажемто Томской области, а также микробные обрастания, развивающиеся на устьях скважин Г-1 и Р-1, вскрывающих докембрийские и кайнозойские отложения в республике Бурятия. Физико-химические характеристики проб воды и описание мест отбора приведены в Таблице 1.

**Температуру, pH и окислительно-восстановительный потенциал** воды измеряли на месте pH-метром HI8314F (Hanna Instruments Deutschland, Vöhringen). Для измерения концентрации $H_2S$ пробы воды фиксировали на месте 2.4% ацетатом цинка. **Концентрацию сероводорода** измеряли спектрофотометрическим методом Пахмайера (Pachmayr, 1960) в трех повторностях с использованием спектрофотометров Smart Spec Plus (Bio-Rad, США) и UV-2600 (Shimadzu Corporation, Япония). **Элементный состав воды** определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ISP-MS) в ХАЦ "ПЛАЗМА" (г. Томск). Образцы воды для химического анализа фильтровали в стерильные флаконы объемом 50 мл через стерилизующий фильтр-насадку Millipore (размер пор 0.22 мкм). **Культивирование сульфидогенных микроорганизмов** проводили на среде Видделя-Бака (WB, Widdel, Bak, 1992) следующего состава (г/л): $Na_2SO_4$ (4.0); $KH_2PO_4$ (0.2); $NH_4Cl$ (0.25); NaCl (1.0); $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.4); KCl (0.5); $CaCl_2$ (0.1). К среде WB в асептических условиях добавляли растворы: витаминов, микроэлементов, кофакторов (селенит-вольфрамата) и восстановитель (сульфид натрия, $Na_2S \cdot 9H_2O$). В зависимости от задач использовали различные доноры и акцепторы электронов. Для **культивирования термофильных спирохет** нами предложена новая основная среда (г/л): $NaNO_3$ (2); $K_2HPO_4$ (1); $MgSO_4$ (0.5); KCl (0.5); $FeSO_4$ (0.01); дрожжевой экстракт (1). К основной среде в асептических условиях добавляли растворы: витаминов, микроэлементов SL-10, кофакторов (селенит-вольфрамата) и восстановитель (сульфид натрия, $Na_2S \cdot 9H_2O$) по Видделю-Баку (Widdel, Bak, 1992).

**Морфологию клеток** изучали с помощью фазово-контрастной и трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Первоначальную **таксономическую идентификацию** новых штаммов проводили путем определения последовательности гена 16S рРНК.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Физико-химическая характеристика мест отбора проб

Отбор проб воды из скважины 1-Р проводили в августе 2013, 2014 и июле 2018 гг. Скважина 1-Р расположена в поселке Белый Яр, Верхнекетского района, Томской области. Скважина пробурена в 1961-1962 гг. на глубину 2.56 км и вскрывает мезозойские отложения. Отбор проб воды из скважины 5-Р проводили в сентябре 2015 г. и июле 2019 г. Скважина расположена в селе Чажемто, Томской области, пробурена в 1957 г. на глубину 2.79 км. Пробы воды и микробных обрастаний скважин Г-1 и Р-1 в поселке Новый Жемчуг республики Бурятия отобраны в августе 2016 г. в местах стока термальной воды у основания обсадной трубы. Нефтепоисковая скважина Г-1 глубиной около 1 км была пробурена в 50-х годах 20-го века и вскрывает водоносный горизонт отложений докембрийского периода. В настоящее время термальная вода поступает с горизонта 834–864 м и используется для лечебных целей. Скважина Р-1 была пробурена в 1953–1954 гг. на глубину 834 м. Вода скважины используется для бальнеологических целей. Скважина изливается непосредственно в небольшой термальный бассейн, а обсадная труба скважины покрыта массивными микробными обрастаниями черного цвета.

Таблица 1. Физико-химическая характеристика проб.

| № скважины / обозначение пробы / Характеристики | 1-Р | 5-Р | Г-1 / Bu 1-1 | Р-1 / Bu 2-2 |
|---|---|---|---|---|
| Местоположение | Томская область | | Республика Бурятия | |
| | поселок Белый Яр | село Чажемто | поселок Малый Жемчуг | |
| Происхождение водовмещающих пород | Мезозойские отложения | | Докембрийские отложения | Кайнозойские отложения |
| Глубина, м | 2563 | 2797 | 834-864 | 834 |
| Т воды на изливе, °С | 40-45 | 14.5-36 | 54.8 | 39.7 |
| pH | 8.3 | 7.43-7.6 | 6.75 | 8.06 |
| Eh, mV | -279<br>-341 | -304<br>-420 | -238 | -586 |
| $H_2S$, мг/л | 0.64-0.88 | 48.7 | 0.933 | 0.930 |

**Выделение и изучение новых представителей рода *Thermodesulfovibrio*.**

Представители рода *Thermodesulfovibrio,* относящегося к филуму *Nitrospira*, судя по молекулярным данным, опубликованным в литературе, широко распространены в подземной биосфере. Специфические нуклеотидные последовательности, характерные для представителей рода *Thermodesulfovibrio*, были обнаружены в воде глубинных водоносных горизонтов мезозойских отложений, вскрываемых нефтепоисковыми скважинами 1-Р и 5-Р в Томской области (Kadnikov et al., 2018). Были предприняты попытки культивирования представителей этого рода из воды скважин.

Первоначальные накопительные культуры из воды скважины 1-Р, образующие сероводород, были получены с добавлением различных доноров электронов и углерода, включая лактат, формиат, ацетат, желатин, и сульфата в качестве акцептора электронов при 50 °С. Накопительная культура была микроскопически неоднородной и содержала палочковидные клетки различного размера, а также нитевидные клетки и вибрионы. Все культивируемые к настоящему времени представители рода *Thermodesulfovibrio* являются вибрионами, поэтому выделение чистой культуры было направлено на отбор клеток в форме вибрионов. Чистая культура вибрионов, обозначенная N1, получена путем выделения отдельных колоний на твердой среде WB. Анализ последовательности гена 16S рРНК, близкой к полной (1386 п.н.), показал, что штамм N1 относится к филуму *Nitrospira*, роду *Thermodesulfovibrio*. Ближайшим валидно описанным родственником штамма N1 является *Thermodesulfovibrio aggregans*, сходство последовательностей гена 16S рРНК составило 97% (рис. 1).

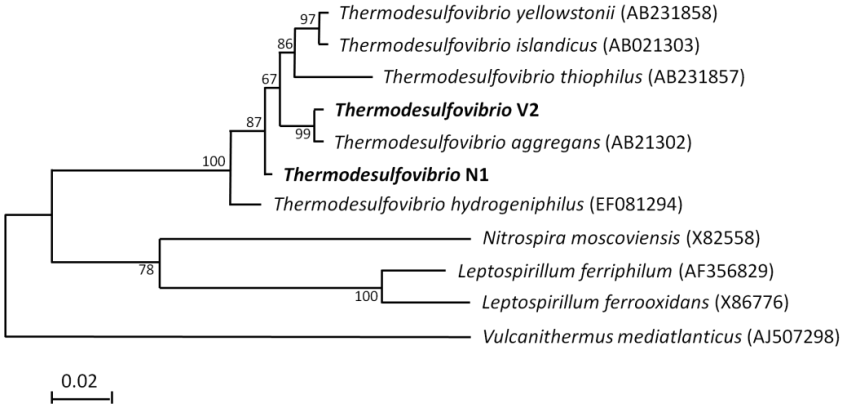



Рисунок 1. Филогенетическое положение штаммов N1 и V2 (выделены жирным шрифтом) на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, определенное методом максимального правдоподобия (maximum likelihood. Масштаб соответствует двум нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов.

Штамм N1 представляет подвижные вибрионы длинной 1.5-2 мкм и шириной 0.4 мкм (рис. 2). Электронная микроскопия клеток штамма N1 показала наличие тонкого пептидогликанового слоя и наружной мембраны. Клетки штамма N1 способны образовывать агрегаты и продуцировать внеклеточный матрикс, формируя биопленки. Температурный диапазон роста штамма N1 составил 45-74 °C, оптимум 65 °C, диапазон pH – 5.5-10.5, оптимальное значение - pH 8.5.

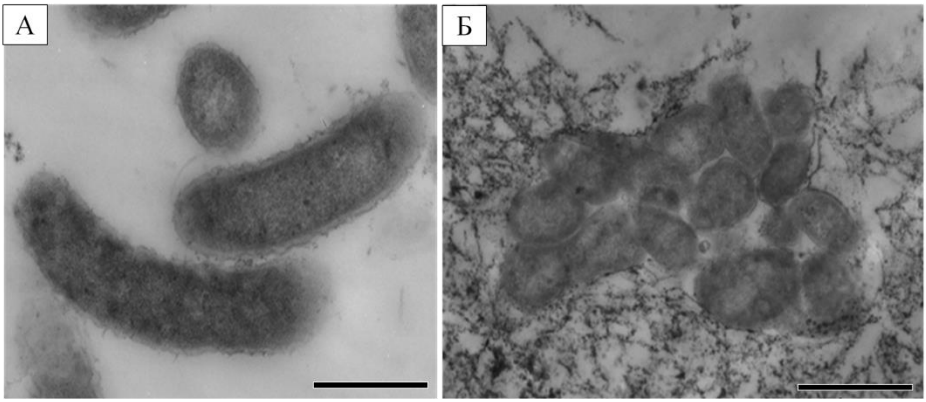



Рисунок 2. ТЭМ клеток *Thermodesulfovibrio* sp. N1: (А) общий вид клеток (масштаб 0.5 мкм) и (Б) агрегаты (масштаб 1 мкм).

Накопительные культуры из воды скважины 5-P, образующие сероводород, были получены на среде WB с добавлением различных доноров электронов и углерода, включая лактат, формиат и фруктозу. Чистая культура вибрионов, обозначенная V2, получена из отдельной колонии, выросшей на твердой питательной среде WB. Штамм V2 был близким родственником *T.aggregans*, - 99% сходства последовательности гена 16S рРНК (рис. 1).

Штамм V2 представлен подвижными вибрионами размером 2.5-3 мкм и шириной около 5 мкм. Нижняя граница температуры роста штамма *Thermodesulfovibrio* sp. V2 составляет 45 °C, верхняя - 74 °C, оптимум для роста - 60 °C. Оптимальный pH для роста штамма составлял 7.2-7.5.

Таким образом, обнаруживаемые в глубинных водоносных горизонтах метагеномным анализом сульфидогенные представители рода *Thermodesulfovibrio* легко поддаются культивированию и выделению в чистую культуру.

**Выделение ‘*Desulforudis audaxviator*’**

Метагеномный анализ микробного сообщества воды скважины 1-P показал, что значительную долю сообщества составляет ранее некультивируемый ‘*Candidatus* Desulforudis audaxviator’ (Kadnikov et al., 2018).

С учетом геномных данных об автотрофии ‘*Candidatus* Desulforudis audaxviator’ для получения накопительной культуры на основной среде WB в качестве источника углерода и электронов выбран формиат, а в качестве акцептора электронов - сульфат. Условия инкубации культуры были подобраны с учетом условий *in situ* - температура 50 °C и pH 8.0. Накопительная культура содержала различные морфотипы клеток: подвижные палочки, нитчатые клетки, кокки и вибрионы. Дальнейшую очистку культуры проводили путем пастеризации (90 °C в течение 20 мин). Полученный изолят обозначили как штамм BYF. Анализ последовательности гена 16S рРНК штамма BYF показал 100% сходство с последовательностью ‘*Candidatus* Desulforudis audaxviator’ MP104. Первоначально штамм BYF рос с длительной лаг-фазой, которая составляла около 1 месяца. Внесение в среду ростовых факторов - ацетата и элементного железа, позволило сократить лаг-фазу до 10 суток.

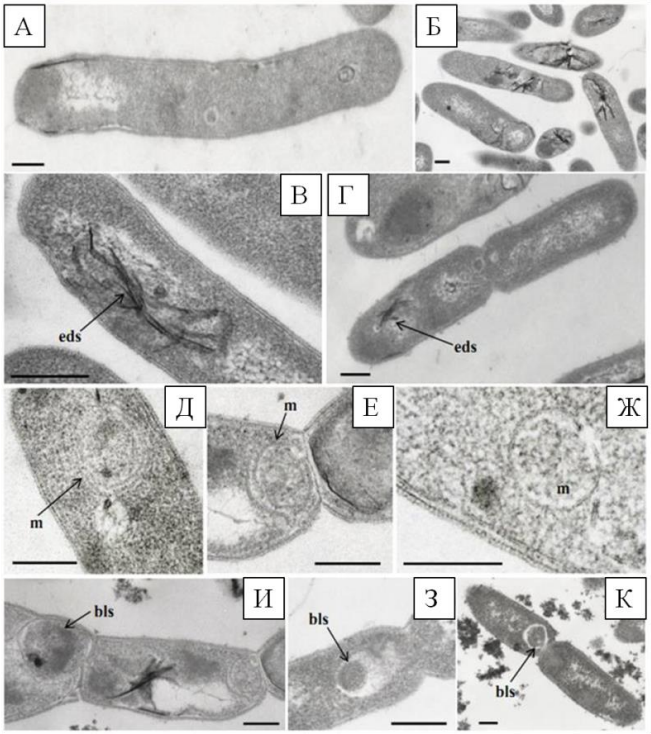
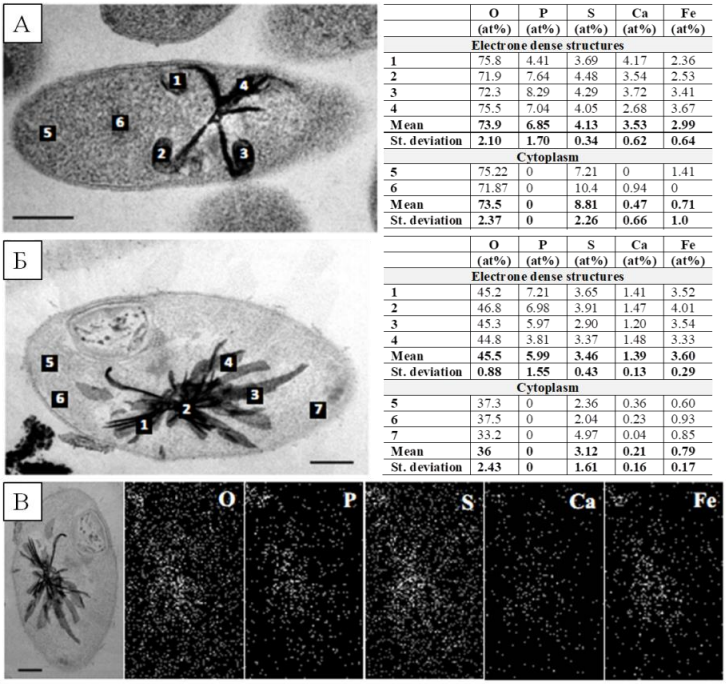



Рисунок 3. ТЭМ микрофотографии штамма BYF: (А) медленно растущие клетки (лаг-фаза месяц), масштабная линейка 5 мкм; (Б-В) быстрорастущие клетки и электронно-плотные структуры; (В-Г) клеточная стенка и электронно-плотная структура; (Д-Ж) мезосомоподобные структуры; (З-К) «почковидные» структуры. Масштабные линейки - 0.2 мкм.

‘*Desulforudis audaxviator’* штамм BYF представляет длинные, тонкие палочки, образующие споры (рис. 3). Оптимальная температура роста штамма BYF - 55 °C, нижняя граница роста – 45 °C, верхняя – 60 °C. Штамм растет в диапазоне значений NaCl от 0 до 1%, с оптимумом - 0.1%. Оптимальное значение pH для роста составляло 8.0, нижняя граница pH - 7.0, верхняя - 9.5.

Кроме формиата ‘*Desulforudis audaxviator*’ BYF может использовать в качестве донора электронов $H_2$, лактат, фумарат, пируват, сукцинат, пропионат, этанол, изобутанол, глюкозу, сахарозу и холин. Штамм BYF не использует для роста ацетат, малат, бензоат, пептон, желатин, цистеин, глицерин, пропанол, фруктозу, микрокристаллическую целлюлозу. Акцепторами электронов для роста ‘*Desulforudis audaxviator*’ BYF являются: сульфат, сульфит, тиосульфат, нитрат, арсенат, нитрилоацетат железа (Fe-NTA), также слабый рост отмечен на фумарате. Штамм BYF не использует элементную серу и нитрит в качестве акцептора электронов.




| | O (at%) | P (at%) | S (at%) | Ca (at%) | Fe (at%) |
|---|---|---|---|---|---|
| **Electrone dense structures** | | | | | |
| **1** | 75.8 | 4.41 | 3.69 | 4.17 | 2.36 |
| **2** | 71.9 | 7.64 | 4.48 | 3.54 | 2.53 |
| **3** | 72.3 | 8.29 | 4.29 | 3.72 | 3.41 |
| **4** | 75.5 | 7.04 | 4.05 | 2.68 | 3.67 |
| **Mean** | **73.9** | **6.85** | **4.13** | **3.53** | **2.99** |
| **St. deviation** | **2.10** | **1.70** | **0.34** | **0.62** | **0.64** |
| **Cytoplasm** | | | | | |
| **5** | 75.22 | 0 | 7.21 | 0 | 1.41 |
| **6** | 71.87 | 0 | 10.4 | 0.94 | 0 |
| **Mean** | **73.5** | **0** | **8.81** | **0.47** | **0.71** |
| **St. deviation** | **2.37** | **0** | **2.26** | **0.66** | **1.0** |

| | O (at%) | P (at%) | S (at%) | Ca (at%) | Fe (at%) |
|---|---|---|---|---|---|
| **Electrone dense structures** | | | | | |
| **1** | 45.2 | 7.21 | 3.65 | 1.41 | 3.52 |
| **2** | 46.8 | 6.98 | 3.91 | 1.47 | 4.01 |
| **3** | 45.3 | 5.97 | 2.90 | 1.20 | 3.54 |
| **4** | 44.8 | 3.81 | 3.37 | 1.48 | 3.33 |
| **Mean** | **45.5** | **5.99** | **3.46** | **1.39** | **3.60** |
| **St. deviation** | **0.88** | **1.55** | **0.43** | **0.13** | **0.29** |
| **Cytoplasm** | | | | | |
| **5** | 37.3 | 0 | 2.36 | 0.36 | 0.60 |
| **6** | 37.5 | 0 | 2.04 | 0.23 | 0.93 |
| **7** | 33.2 | 0 | 4.97 | 0.04 | 0.85 |
| **Mean** | **36** | **0** | **3.12** | **0.21** | **0.79** |
| **St. deviation** | **2.43** | **0** | **1.61** | **0.16** | **0.17** |

Рисунок 4. Микрофотографии ТЭМ с энергодисперсионной спектроскопией (TEM-EDS) и соответствующие атомные проценты O, P, S, Ca и Fe, измеренные в электронно-плотных структурах и цитоплазме штамма BYF. Клетки на среде с формиатом и ацетатом, растущие в течение (А) 19, (Б) 34, (В) 14 дней. Масштабные линейки - 0.2 мкм.

Из литературных данных известны примеры, когда культивирование прокариот может быть оптимизировано не путем нахождения более эффективных энергетических субстратов, а изменением содержания в среде азота и фосфора. Электронная микроскопия выявила в клетках BYF электронно-плотные структуры, напоминающие ацидокальцисомы (рис. 3, 4). Исследования элементного состава образований подтвердили, что электронно-плотные структуры обогащены кальцием, железом и фосфором (рис. 4). В местообитании штамма BYF, в воде скважины 1-P, концентрация кальция ниже 10 мг/л и присутствуют только следовые количества фосфора. Мы предположили, что культивирование на основной среде WB, содержащей 0.1 г/л $CaCl_2$ и 4.0 г/л $KH_2PO_4$, может приводить к отложению избыточного фосфора и кальция в ацидокальцисомах, вызывая дополнительные затраты энергии, что приводит к снижению скорости роста. В силу специфики местообитания штамма BYF простое разбавление основной среды, используемое исследователями при культивировании олиготрофов, не подходит для выращивания организмов из глубинных подземных горизонтов. На основе полученных предварительных данных был поставлен следующий эксперимент. В первом варианте опыта концентрация $CaCl_2$ в модифицированной среде WB была снижена с 0.113 до 0.025 г/л без изменения других компонентов среды. Во втором варианте - концентрация $KH_2PO_4$ была снижена с 0.2 до 0.05 г/л основной среды. В контрольном варианте состав среды не изменяли. Культивирование штамма BYF в двух опытных вариантах на модифицированных средах приводило к увеличению количества клеток в культуре по сравнению с контролем (рис. 5). Максимальная численность клеток в конце логарифмической фазы роста составляла $1.2 \cdot 10^6$ кл/мл на среде со сниженной концентрацией кальция, в то время как в контроле не превышала $1.5 \cdot 10^5$ кл/мл. Снижение концентрации кальция и фосфатов приводило к сокращению лаг-фазы по сравнению с контролем. При этом удельная скорость роста на среде с пониженным содержанием кальция возросла до 0.046 $ч^{-1}$ (время удвоения 15.1 ч) по сравнению с 0.026 $ч^{-1}$ (время удвоения 26.7 ч) в контроле.

В геноме '*Desulforudis audaxviator'* присутствуют гены белков синтеза полиаминов. Спермидин синтаза и агманитаза (необходима для синтеза предшественника спермидина) находятся в одном опероне, что предполагает существование действующего пути синтеза спермидина у бактерии. В наших экспериментах мы дополнительно вносили спермидин (1.45 мг/л) в модифицированную среду WB. В среде с добавлением спермидина наблюдали максимальную удельную скорость роста штамма BYF, которая составляла 0.086 $ч^{-1}$ (время удвоения 8.05 ч), а максимальная концентрация клеток в конце логарифмической фазы достигала $7 \cdot 10^5$ кл/мл. Добавление спермидина также сокращало длительность лаг-фазы. Таким образом, снижение концентрации кальция и фосфора в основной среде WB и дополнительное внесение спермидина позволяет культивировать '*Desulforudis audaxviato*r' BYF в

лабораторных условиях со скоростями сравнимыми с таковыми для классических анаэробов.

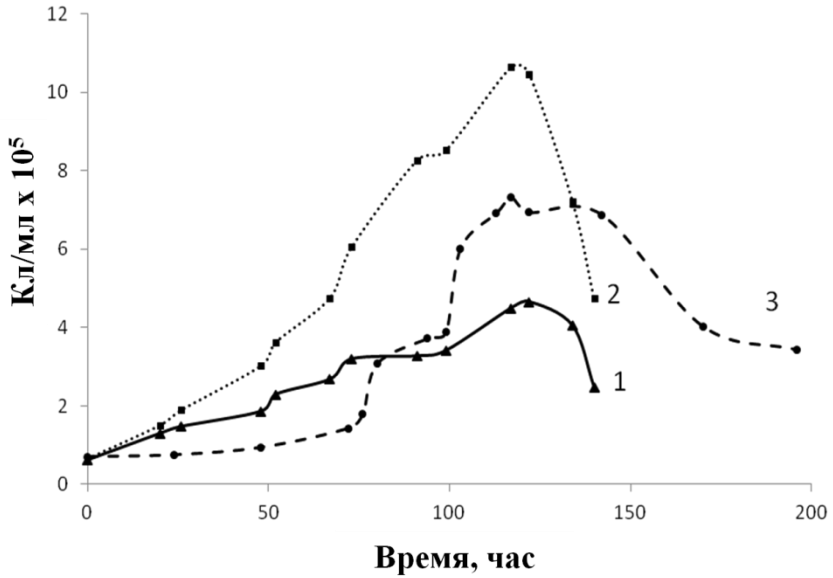



Рисунок 5. Рост '*Desulforudis audaxviator'* BYF на среде WB с формиатом: (1) контроль; (2) среда со сниженной концентрацией $KH_2PO_4$; (3) среда со сниженной концентрацией $CaCl_2$.

**Использование микробных обрастаний для получения культур прокариот из глубинных термальных вод**

Микробные обрастания (маты) на выходе термальных глубинных скважин могут служить своеобразными ловушками и биоконцентраторами клеток микроорганизмов подземной биосферы. Микроорганизмы подземных экосистем в таких условиях могут получать дополнительные преимущества для роста благодаря существующему в матах градиенту физико-химических условий и большей доступностью потенциальных доноров электронов и, соответственно, могут быть легче выделены в культуру.

Накопительные культуры СРБ микробных обрастаний скважины Г-1 (рис. 6) получены на среде WB с сульфатом при различных значениях pH (3, 7 и 9), донорах электронов и углерода: ацетат, глицерин, глюкоза, изобутират, лактат, малат, пируват, пропионат, сахароза, сукцинат, формиат, фумарат и этанол. Чистые культуры СРБ из микробных обрастаний скважины Г-1 получены из отдельных колоний, выросших на твердой питательной среде. Для отбора спорообразующих форм при очистке накопительных культур использовали пастеризацию, температура и длительность пастеризации

варьировали в зависимости от накопительной культуры (90-95 °С, длительность от 15 до 25 мин). Были выбраны перспективные накопительные культуры, растущие на среде WB с добавлением (1) изобутирата и (2) ацетата в качестве доноров углерода и электронов, а также сульфата в качестве акцептора. Изолят, выделенный на среде с изобутиратом, был обозначен как Bu 1-1, а на среде с ацетатом – BuA. Анализ гена 16S рРНК показал, что ближайшими родственниками штамма Bu 1-1 являются представители рода *Desulfallas*, однако все они значительно удалены. Сходство последовательностей гена 16S рРНК штамма Bu 1-1, рассчитанное с помощью EzTaxon (Chun et al., 2007) на платформе BIOiPLUG, составляло: 92.77% с *Desulfallas alcoholivorax*, 92.57% – с *Desulfallas sapomandens*, 92.43% – с *Desulfallas geothermicus*, 91.53% – с *Desulfallas artcticus*, 91.27% – с *Desulfallas thermosapovorans*. Штамм Bu 1-1, вероятно, является представителем нового вида. Ближайшим родственником штамма BuA является *Desulforamulus putei* со сходством последовательностей 99.85%. Вероятно, штамм BuA является новым штаммом *D. putei*.

Штамм Bu 1-1 представлен палочковидными клетками с центральной или субтерминальной спорой (рис. 6). Размер клеток - 1.4-2.8 мкм (длина) и 0.5 мкм (ширина). Границы температуры роста штамма Bu 1-1 составляют 37-60 °С, оптимум – 50-55 °С. Границы pH – 6.8-9.0, оптимум pH – 7.0-7.2.

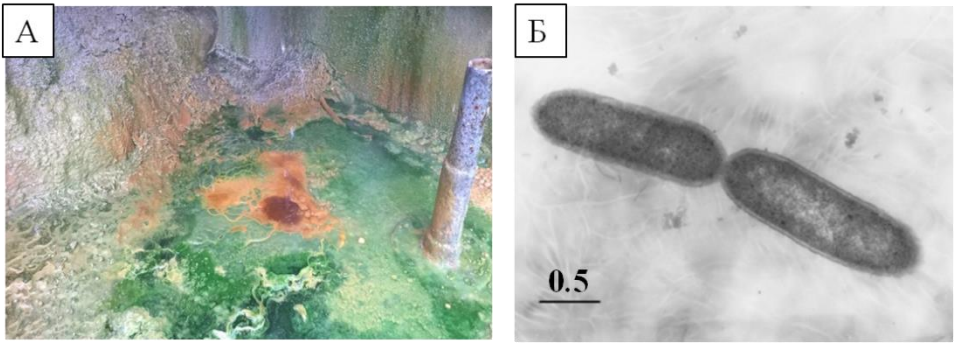



Рисунок 6. Микробные обрастания на устье скважины Г-1 (А) и микрофотография (ТЭМ) клеток штамма Bu1-1 (Б). Масштабная линейка – 0.5 мкм.

В 2019 г. был описан новый род *Thermoanaerosceptrum* филогенетически удаленный от известных представителей *Firmicutes* (Hamilton-Brehm et al., 2019). Экология этой группы остается неизученной, так как единственный известный представитель, *T. fracticalcis*, получает энергию, используя фумарат, источник которого в подземных водах не очевиден. Бактерия не способна использовать ни одну из окисленных форм серы (сульфат, сульфит, тиосульфат, элементная сера) в качестве акцептора электронов для дыхания, хотя в геноме присутствуют белки, необходимые для осуществления

диссимиляционного восстановления сульфата. Изучение экологии *T. fracticalcis* затрудняет тот факт, что организм является минорным компонентом сообщества, поэтому были предприняты попытки выделить *T. fracticalcis* из микробных обрастаний.

Активные накопительные культуры спорообразующих сульфидогенов были получены из микробных обрастаний скважины Р-1 (республика Бурятия) на среде WB с глюкозой. Выделенную морфологически однородную культуру сульфидогенов обозначили BuN1. Анализ последовательности гена 16S рРНК показал, что штамм BuN1 относится к роду *Thermoanaerosceptrum* (рис. 7). Сходство последовательностей гена 16S рРНК с единственным известным видом, *T. fracticalcis*, составляло 97.6%. Штамм BuN1 существенно отличался от *T. fracticalcis,* прежде всего способностью к восстановлению сульфата (рис. 8).

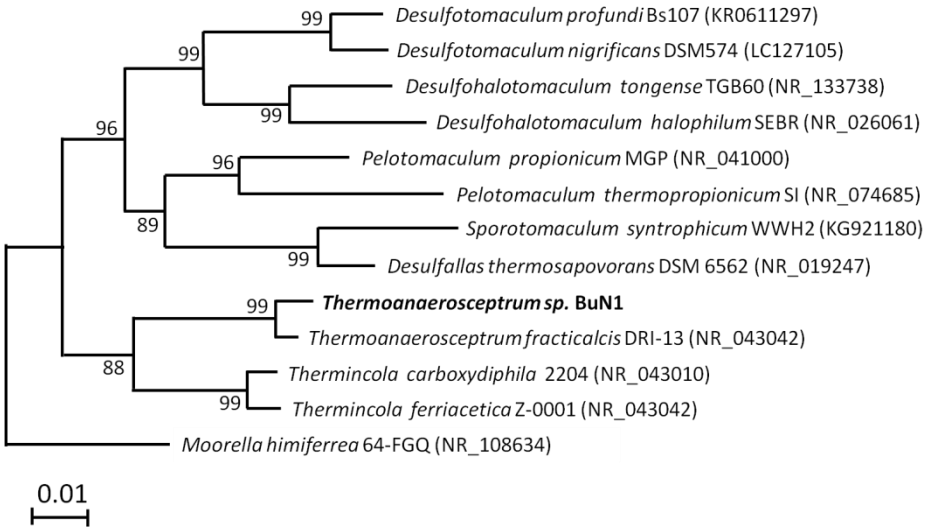



Рисунок 7. Филогенетическое положение штамма BuN1 (выделен жирным шрифтом), определенное на основе анализа последовательностей гена 16S рРНК с использованием программы FastTree (Price et al., 2009). Последовательности выровнены в онлайн сервисе SINA ACT (https://www.arb-silva.de/aligner/).

Наряду с сульфатом штамм BuN1 восстанавливал сульфит и тиосульфат, но не элементную серу, нитрат или фумарат. *T. fracticalcis* не использует сахара (Hamilton-Brehm et al., 2019), в то время как на глюкозе, фруктозе и сахарозе наблюдали наиболее активный рост штамма BuN1. Наиболее активный рост штамм демонстрировал на среде с сахарозой – скорость роста составляла 0.22 $ч^{-1}$, время удвоения 3.2 ч, рост на фруктозе и глюкозе был слабее. При достаточно высокой для анаэроба скорости роста штамм не накапливал значительной биомассы, численность клеток достигала 2.5

x$10^5$ кл/мл в конце экспоненциальной фазы (рис. 8). Содержание сероводорода увеличивалось с ростом клеток и составляло 25 мг/л после 60 ч культивирования. Максимальное содержание сероводорода, зафиксированное при культивировании, составляло 72 мг/л среды.

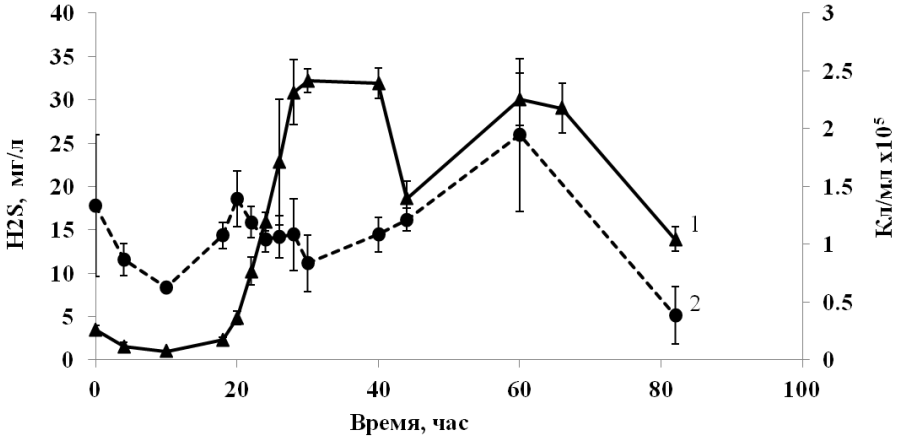



Рисунок 8. Рост *Thermoanaerosceptrum* sp. BuN1 на сахарозе, (1) количество клеток, и (2) изменение концентрации $H_2S$ в среде. Вертикальные линии показывают стандартное отклонение.

### 3.5 Культивирование спирохет из глубинных водоносных горизонтов

Реконструирование геномов прокариот из метагенома (MAG) дает ключ к выделению чистых культур и оптимизации культивирования благодаря данным о метаболизме. В результате метагеномных исследований воды пород мезозойских отложений, вскрываемых глубинными скважинами 1-Р и 5-Р в Томской области, были идентифицированы филогенетически удаленные спирохеты, составляющие незначительную долю (0.8-2.0%) в микробном сообществе водоносного горизонта (Kadnikov et al., 2018).

Стратегия культивирования и выделения в чистую культуру свободноживущих термофильных спирохет из воды скважин 1-Р и 5-Р была разработана на основе геномных и метагеномных данных. Учитывая прогнозируемый гидролитический потенциал спирохеты из скважины 1-Р, мальтоза и крахмал были выбраны субстратами для роста. Первоначальная накопительная культура из воды скважины 1-Р была получена на модифицированной среде WB с мальтозой. Инкубировали накопительную культуру при 50 °C и pH 8. Одиночные спирохетоподобные клетки наблюдали в накопительных культурах, где присутствовали клетки сульфидогенов, а накопление биомассы спирохетоподобных клеток было связано с

продуцированием сероводорода клетками сульфидогенов. Спирохеты росли только при совместном культивировании со спорообразующими палочковидными сульфидогенами (рис. 9). Чистая культура спирохеты, обозначенная NS, была получена из отдельной колонии, выросшей на твердой питательной среде. Накопление биомассы было связано с концентрацией $H_2S$ в среде, поэтому подобрали оптимальное количество восстановителя (сульфида, $Na_2S \cdot 9H_2O$) в среде, составляющее 96 мг/л. Изменение температуры инкубирования (55 °C) и pH среды WB (pH 8.0) также привело к лучшему росту штамма NS. Разработанная для культивирования спирохет среда помогла получить достаточное количество биомассы для выделения ДНК и секвенирования гена 16S рРНК. Анализ последовательности гена 16S рРНК штамма NS показал 82% идентичности последовательностей с единственным культивируемым представителем семейства *Brevinemataceae, Brevinema andersonii* CT11616 (Defosse et al., 1995). Идентичность аминокислотного состава генома (AAI) штамма NS и *B. andersonii* составила 40.71%, что соответствует отнесению этих двух организмов к разным семействам в соответствии с пороговыми значениями, предложенными для таксономического разграничения (Konstantinidis et al., 2017).

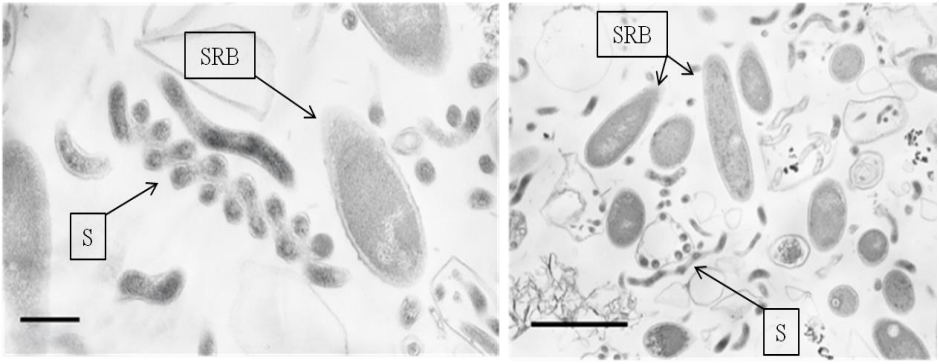



Рисунок 9. Микрофотографии (ТЭМ) накопительной культуры, содержащей спирохетоподобные клетки (S) и спорообразующие клетки сульфидогенов (SRB). Масштабная линейка - 0.5 мкм.

Фазово-контрастная микроскопия клеток штамма NS показала, что клетки формируют различные образования (сферические тельца). Тельца видны на ранних стадиях культивирования (около 1-2 дней) и при переходе культуры в стационарную фазу и фазу гибели клеток. Исследование ультратонких срезов методом ТЭМ подтвердило формирование сферических образований, в которых плотно уложены клетки (рис. 10).

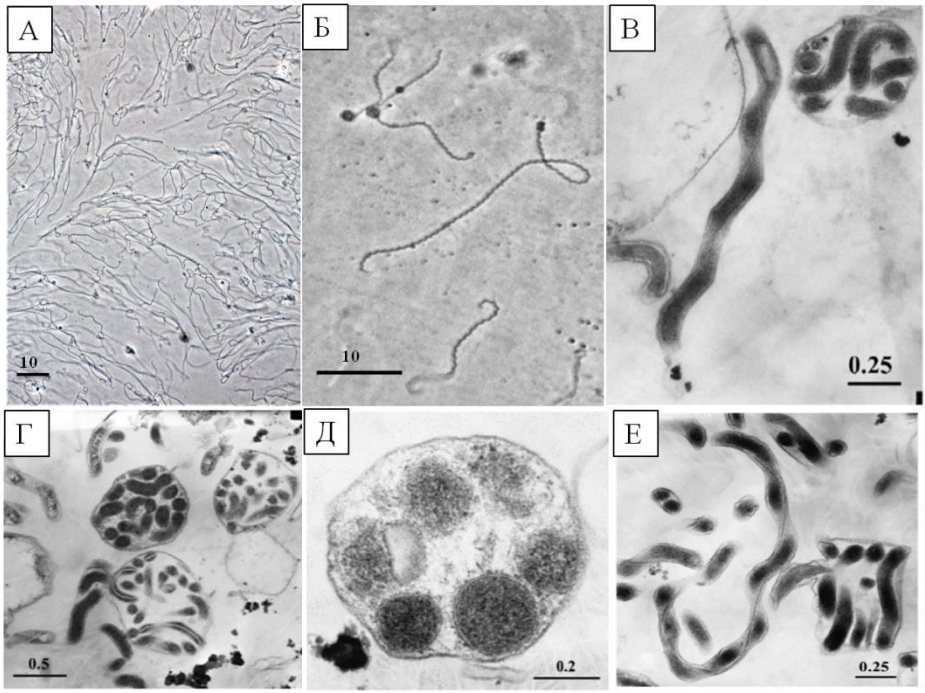



Рисунок 10. Фазово-контрастная микроскопия слизистого мата (А), клеток (Б) и микрофотографии (ТЭМ) ультратонких срезов клеток (В, Е) и округлых телец (Г-Д) штамма NS. Масштаб в мкм.

Штамм NS растет при pH 6.5-9.0, оптимальный рост при pH 8.0. Штамм не нуждается в добавлении NaCl в среду. Увеличение концентрации NaCl до 1% приводит к удвоению продолжительности лаг-фазы и снижению количества клеток. Штамм NS рос в пределах температур от 37 до 65 °C с оптимумом при 55 °C. Штамм NS использует узкий спектр органических субстратов, включая мальтозу, глюкозу и крахмал. Медленный рост отмечен на фруктозе, сахарозе, лактозе, раффинозе, галактозе и декстрине. Штамм NS не растет на арабинозе, рамнозе, хитине, хитозане, сорбитоле, микрокристаллической целлюлозе, карбоксиметилцеллюлозе, целлюлозе, этаноле, глицерине и манните.

На основе подхода, разработанного для культивирования и выделения штамма NS из воды мезозойских отложений, вскрываемых скважиной 5-Р, выделена вторая термофильная спирохета. Чистая культура получена из отдельной колонии, выросшей на твердой питательной среде, штамм обозначен N5R. Штамм N5R мог расти при pH от 3.5 до 9.0 с оптимумом 7.5. Оптимальный рост наблюдали без добавления NaCl в питательную среду. Штамм может выдерживать до 1% NaCl, при 2% NaCl рост прекращался. Штамм N5R растет

при температуре 37- 65 °C, оптимум – 50 °C. Оптимальные субстраты для роста штамма N5R – декстрин и крахмал. Медленный рост наблюдали на глюкозе, раффинозе и рамнозе. Штамм N5R не использует мальтозу, лактозу, галактозу, желатин, этанол, сорбит и лактат.

Филогенетическое положение штаммов NS и N5R также было проанализировано путем построения филогенетического дерева на основе конкатенированных последовательностей 120 консервативных бактериальных маркерных генов. Штамм NS представляет отдельную линию на уровне семейства в классе *Brevinematia*, сестринскую по отношению к представителям GWF1-51-8 и *Brevinema andersonii* (рис.11).

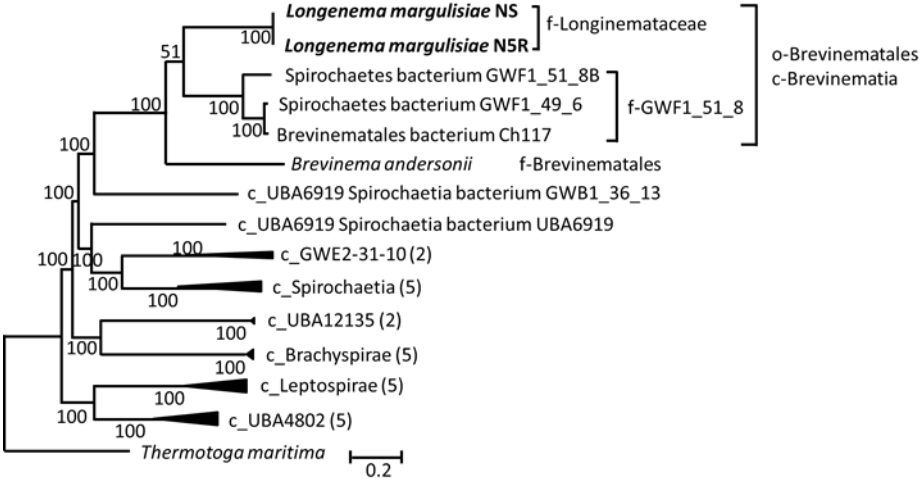



Рисунок 11. Филогенетическое дерево, основанное на сравнении конкатенированных последовательностей 120 консервативных бактериальных маркерных генов, определенное методом maximum likelihood и показывающее положение штаммов NS и N5R (выделены жирным шрифтом) по отношению к другим представителям филума *Spirochaetes*.

На основании физиологии и геномных данных штамм NS был описан как типовой штамм нового вида ‘*Longinema margulisiae*’ sp. nov., нового рода ‘*Longinema*’, нового семейства ‘*Longinemataceae*’

**Описание ‘*Longinema*’ gen. nov**. ‘*Longinema’* (Lon. gi. ne’ ma. L. adj. longus, длинный; Gr. N. nema, нить; N.L. neut. n Longinema, длинная нить.) Грамотрицательные, гибкие спиральные клетки диаметром 0.07-0.1 мкм и длиной до 50 мкм. Клетки имеют периплазматические жгутики и образуют округлые тела диаметром до 1.5 мкм. Облигатно анаэробные. Термофильные. Хемоорганогетеротрофные. Сахара являются предпочтительными субстратами

для роста. Способны гидролизовать несколько полисахаридов, включая крахмал и декстрин. Культивирование в средах, содержащих $H_2S$. Свободноживущие. Типовым видом является ‘*L. margulisiae’* $NS^T$.

**Описание ‘*L. margulisiae’* sp. nov**. ‘*Longinema margulisiae’* (mar.gu.lis’i.ae. N.L. gen. Fem. n.). Название вида дано в честь Линн Маргулис за ее вклад в области изучения биологии спирохет. Температурный диапазон роста 37-65 °C с оптимумом 50-55 °C. Диапазон pH роста 6.5-9.0 с оптимумом 7.5-8.0. Рост отсутствует при концентрации NaCl выше 2%. Описание вида основано на свойствах штаммов $NS^T$ (ВКМ B-3452$^T$) и N5R, которые были выделены из воды глубинных водоносных горизонтов (Томская область, Россия).

**Описание ‘*Longinemataceae’* fam. nov**. Описание такое же, как и для рода ‘*Longinema’* gen. nov. Семейство принадлежит к отряду *Brevinematales*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекулярные исследования показывают, что сульфидогены, прежде всего сульфатредуцирующие прокариоты, являются одной из основных физиологических групп микроорганизмов, широко распространённых в глубинных термальных водоносных горизонтах. До настоящего времени получение культивируемых изолятов этой физиологической группы представляет трудности. Наши исследования показали, что представители рода *Thermodesulfovibrio* (филум *Nitrospirae*) хорошо поддаются культивированию и являются «легким» объектом для выделения в чистую культуру. Все охарактеризованные на сегодняшний день представители рода *Thermodesulfovibrio* являются нейтрофилами. Нами выделен первый алкалотолерантный представитель рода, *Thermodesulfovibrio* sp. N1. Большинство глубинных термальных вод Западно-Сибирского артезианского бассейна, объекта выделения сульфидогенов, имеет слабощелочную реакцию среды. Поэтому присутствие алкалотолерантных и алкалофильных форм согласуется с условиями исследованных биотопов.

В отличие от представителей филума *Nitrospirae*, сульфидогены, относящиеся к *Firmicutes*, представляют трудную задачу для культивирования. Среди них – знаменитый ‘*Candidatus* Desulforudis audaxviator’, образующий уникальное микробное сообщество, состоящее из одного вида, во фракционной воде глубинной шахты Мпоненг в Южной Африке (Chivian et al., 2008). Композитный геном этой бактерии был секвенирован, обнаружена способность к сульфатредукции и гидрогенотрофному росту. Мы впервые культивировали эту бактерию из подземных термальных вод мезозойских отложений в Томской области. ‘*Desulforudis audaxviator*’ штамм BYF был выделен в чистую культуру. Создание специальной среды, дефицитной по кальцию и содержащей полиамин спермидин, позволило культивировать организм в лабораторных условиях со скоростями роста сопоставимыми с другими сульфидогенами филума

*Firmicutes*. Изучение физиологии штамма BYF продемонстрировало широкий круг возможных доноров электронов, а изучение микроструктуры клеток выявило газовые вакуоли, связанные со спорами.

В качестве специального подхода для культивирования сульфидогенных представителей *Firmicutes* из глубинных термальных горизонтов мы использовали микробные обрастания на устье артезианских скважин. Микробные маты являются своеобразными ловушками и биоконцентраторами вегетативных клеток и спор микроорганизмов подземной биосферы. Использование микробных матов на устье скважин в качестве инокулята позволило выделить *Desulfallas* sp. Bu 1-1, *Desulforamulus putei* BuA, *Thermoanaerosceptrum* sp. BuN1.

Другой подход к культивированию «некультивируемых» организмов подземной биосферы связан с изучением геномной информации доступных композитных геномов и формулированием сред и условий на ее основе. Таким образом, был выделен спутник сульфидогенов – термофильная спирохета, чья доля в сообществе микроорганизмов не превышает 0.6%. Новое семейство спирохет, обнаруженное с помощью геномного анализа и культивирования, имеет некоторые общие черты с другими спирохетами. К ним относятся хемоорганогетеротрофный образ жизни с полисахаридами в качестве предпочтительного субстрата для ферментации и отсутствие дыхательных цепей. Отсутствие развитых механизмов защиты от окислительного стресса связано с образованием консорциумов с сульфидогенами, образующими сильный восстановитель – сероводород. Описано новое семейство ‘*Longinemataceae*’, новый род ‘*Longinema*’ gen. nov., и его типовой вид ‘*Longinema margulisiae*’ sp. nov.

## ВЫВОДЫ

1. Представители рода *Thermodesulfovibrio* широко распространены в глубинных термальных водах и легко поддаются культивированию. Выделен в чистую культуру первый алкалотолерантный представитель этого рода – *Thermodesulfovibrio* sp. N1. Максимальная скорость роста штамма N1 отмечена при pH 8.5, рост возможен до pH 10.5.

2. Из глубинного горизонта нижнемеловых отложений, вскрываемого скважиной 1-Р, поселок Белый Яр, Томская область, выделен в чистую культуру '*Desulforudis audaxviator*' штамм BYF. Разработана среда и оптимизированы условия культивирования штамма BYF, обнаружены газовые вакуоли и электронно-плотные структуры, обогащенные фосфором, кальцием и железом.

3. С использованием микробных обрастаний, формирующихся на изливе глубинных термальных скважин, выделены чистые культуры новых сульфидогенных термофильных *Firmicutes*: *Desulfallas* sp. Bu 1-1, *Desulforamulus putei* sp. BuA и *Thermoanaerosceptrum* sp. BuN1. Показана способность *Thermoanaerosceptrum* sp. BuN1 к диссимиляционной сульфатредукции.

4. С использованием данных композитного генома выделены чистые культуры новых термофильных спирохет из подземного водоносного горизонта мезозойских отложений Западно-Сибирского артезианского бассейна, вскрываемого нефтепоисковыми скважинами 1-Р и 5-Р в Томской области. Спирохета описана как новый вид '*Longinema margulisiae'* sp. nov. нового рода '*Longinema'* и нового семейства '*Longinemataceae'*.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Экспериментальные статьи**

1. **Лукина А.П.**, Карначук О.В. Новая среда для культивирования ‘*Desulforudis audaxviator’* // Микробиология. – 2021. – Т. 90. – № 3. – С. 367-371. – DOI:10.31857/S0026365621030101.

2. Karnachuk O.V., **Lukina A.P.**, Kadnikov V.V., Sherbakova V.A., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Ravin N.V. Targeted isolation based on metagenome-assembled genomes reveals a phylogenetically distinct group of thermophilic spirochetes from deep biosphere // Environmental Microbiology. – 2021. – Vol. 23(7). – P. 3585-3598. – DOI:10.1111/1462-2920.15218.

3. **Лукина А.П.**, Авакян М.Р., Данилова Э.В., Карначук О.В. Использование микробных обрастаний для выделения спорообразующих прокариот из подземной биосферы // Микробиология. – 2020. – Т. 89. – № 6. – С. 748-752. – DOI:10.31857/S0026365620060129.

4. **Лукина А.П.**, Франк Ю.А., Ивасенко Д.А., Глухова Л.Б., Данилова Э.В., Авакян М.Р., Карначук О.В. Выделение новых термофильных сульфидогенов из микробных обрастаний, ассоциированных с местом излива подземных вод в тункинской долине // Микробиология. – 2019. – Т. 88. – № 5. – С. 642-645. – DOI:10.1134/S0026365619050100.

5. Karnachuk O., Frank Y., **Lukina A.**, Kadnikov V., Beletsky A., Mardanov A., Ravin N. Domestication of previously uncultivated Candidatus Desulforudis audaxviator from a deep aquifer in Siberia sheds light on its physiology and evolution // ISME Journal. – 2019. – V. 13(8). – P. 1947-1959. – DOI:10.1038/s41396-019-0402-3.

6. Frank Y., Kadnikov V., **Lukina A.**, Banks D., Beletsky A., Mardanov A., Sen`kina E., Avakyan M., Karnachuk O., Ravin N. Characterization and genome analysis of the first facultatively alkaliphilic *Thermodesulfovibrio* isolated from the deep terrestrial subsurface // Front. Microbiol. – 2016. – V. 7 – 2000 – doi.org/10.3389/fmicb.2016.02000.

**Тезисы конференций**

1. Франк Ю.А., **Лукина А.П**., Абрамова А.В., Глухова Л.Б., Карначук О.В. Выделение новой сульфидогенной бактерии из подземных горизонтов западно-сибирского артезианского бассейна // Материалы 2-го Российского Микробиологического Конгресса: 23-27 сентября 2019 г. – Саранск – С. 168-169.

2. **Лукина А.П.**, Гавенко А.А., Анциферов Д.В., Глухова Л.Б., Франк Ю.А., Карначук О.В. Микробные маты, ассоциированные с выходами глубинных термальных вод, как источник для культивирования новых организмов подземной биосферы // Материалы 2-го Российского Микробиологического Конгресса: 23-27 сентября 2019 г. – Саранск – С. 121-122.

3. Frank Y., **Lukina A.**, Kalanda N., Druganov D., Gavenko A., Karnachuk O. Geochemical activity of sulfate-reducing bacteria from a deep aquifer in west Siberia // Extremophiles, book of abstracts: 16-20 September 2018 – Ischia, Italy – P. 38.

4. Климова К.М., Франк Ю.А., **Лукина А.П.**, Сенькина Е.И., Анциферов Д.В., Карначук О.В. Использование малорастворимого сульфата стронция сульфатредуцирующим микроорганизмом из подземного биосферы // Сборник тезисов XII Молодежной школы-конференции с международным участием: «Актуальные аспекты современной микробиологии». – 9-10 октября 2017 г. – Москва. – С. 54-56.

5. Франк Ю.А., **Лукина А.П**., Иккерт О.П., Авакян М.Р., Карначук О.В. Образование сульфидов металлов новым термофильным *Thermodesulfovibrio* из подземной биосферы // Сборник тезисов X Молодежной школы-конференции с международным участием: «Актуальные аспекты современной микробиологии». – 27-30 октября 2015 г. – Москва. – С. 157-160.

6. **Лукина А.П**., Франк Ю.А., Иккерт О.П., Карначук О.В. Образование сульфидов железа новыми термофильными *Thermodesulfovibr*io из глубинной биосферы // Сборник тезисов Всероссийской молодежной научной конференции с международным участием: «Биотехнология, биоинформатика и геномика растений и микроорганизмов». – 26-28 апреля 2016 г. – Томск. – С. 54-58.

7. **Лукина А.П**., Суворина С.С., Сенькина Е.И., Франк Ю.А., Карначук О.В. Физиологические особенности новой термофильной бактерии *Thermodesulfovibrio* sp. N1 из глубинной биосферы // Сборник тезисов Всероссийской молодежной научной конференции с международным участием: «Биотехнология, биоинформатика и геномика растений и микроорганизмов». – 26-28 апреля 2016 г. – Томск. – С. 64-67.

8. Франк Ю.А., Соломина Е.А., Суворина С.С., **Лукина А.П.**, Карначук О.В. Молекулярная детекция бактериофага в культурах микроорганизмов из глубинной подземной экосистемы в Томской области // Сборник тезисов Всероссийской молодежной научной конференции с международным участием: «Биотехнология, биоинформатика и геномика растений и микроорганизмов». – 26-28 апреля 2016 г. – Томск. – С. 79-81.

9. Франк Ю.А., Климова К.М., **Лукина А.П.**, Каланда Н.С., Карначук О.В. Устойчивость к металлам у представителей *Nitrospirae* из глубинной биосферы // Сборник тезисов X Молодежной школы-конференции с международным участием: «Актуальные аспекты современной микробиологии». – 1-2 ноября 2016 г. – Москва. – С. 74-78.

10. Frank Y., **Lukina A.**, Kadnikov V., Banks D., Bukhtiyarova P., Ravin N., Karnachuk O. Sampling of a deep hydrocarbon exploration well in Western Siberia reveals deeply branched bacterial phylotypes // Extremophiles, book of abstracts, 7-11 сентября 2014 г. – Санкт-Петербург – P. 103.

11. **Лукина А.П.**, Франк Ю.А., Карначук О.В. Культивирование сульфидогенных микроорганизмов из воды глубинной скважины 1-Р (Верхнекетский район Томской области) // Сборник тезисов Всероссийской молодежной научной конференции с международным участием: «Современная микробиология и биотехнология глазами молодых исследователей». – 2-4 апреля 2014 г. – Томск. – С. 27-29.