

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Национальный исследовательский Томский  
государственный университет»

*На правах рукописи*

Лукина Анастасия Петровна

**ВЫДЕЛЕНИЕ НОВЫХ СУЛЬФИДОГЕНОВ ИЗ ПОДЗЕМНЫХ  
ВОДОНОСНЫХ ГОРИЗОНТОВ**

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

1.5.11 Микробиология

**Научный руководитель:**  
доктор биологических наук,  
профессор,  
Карначук О.В.

**Москва 2023**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	15
1.1 Подходы к культивированию «некультивируемых» микроорганизмов. .....	15
1.2 Микроорганизмы подземной биосферы.....	20
1.2.1 Сульфидогены в подземной биосфере.....	24
1.2.2 Геохимическая роль сульфатредуцирующих бактерий в глубинных подземных местообитаниях .....	25
Глава 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	28
2.1 Объекты исследования .....	28
2.2. Методы отбора проб подземной воды и определение физико-химических параметров .....	29
2.3 Культивирование сульфидогенов.....	29
2.4 Культивирование анаэробных микроорганизмов.....	31
2.5 Изучение морфологии, физиологии и таксономии чистых культур .....	32
2.6. Материаловедческий анализ осадков .....	36
2.7. Аналитические методы исследования и статистическая обработка данных .....	37
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....	39
3.1. Физико-химическая характеристика проб воды.....	39
3.2 Выделение и изучение новых <i>Thermodesulfovibrio</i> spp.....	41
3.3. Выделение ‘ <i>Desulforudis audaxviator</i> ’ .....	49
3.4 Образование сульфидов железа микроорганизмами подземной биосферы .....	60
3.5 Использование микробных обрастаний для получения культур микроорганизмов подземной биосферы.....	67
3.5.1 <i>Desulfallas</i> sp. Bu 1-1 и <i>Desulfotomaculum</i> sp. BuA.....	67
3.5.2 <i>Thermoanaerosceptrum</i> sp. BuN1 .....	71
3.6 Культивирование спирохет из подземной биосферы.....	77
ОБСУЖДЕНИЕ .....	83
ВЫВОДЫ.....	93

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	94
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	95

## ВВЕДЕНИЕ

### 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 геномных данных, которое привело к лучшему пониманию разнообразия бактерий и архей, контрастирует с нашей неспособностью культивировать представителей новых линий прокариот (Lewis et al., 2021). Следовательно, большая часть того, что мы в настоящее время знаем о прокариотах, получена либо из меньшинства хорошо изученных культивируемых линий, либо из реконструированных геномов некультивируемых линий (Castelle and Banfield, 2018). Культивирование необходимо для верификации полученных из генома данных о клеточной биологии и физиологии микроорганизмов, и для понимания их экологической роли. Без чистых культур или в некоторых случаях, ко-культур (содержащих небольшое количество видов) трудно точно 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., 2018).

«Подземную биосферу» определяют как часть биосферы, находящуюся 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 °С. По последним оценкам микроорганизмы глубинных экосистем составляют около 15 % живой биомассы 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). Глубоководные

и наземные подповерхностные среды обитания содержат множество функционально активных микробных сообществ, существование которых лимитировано повышением температуры с глубиной (Teske, 2005; Itävaara et al., 2011; Lomstein et al., 2012; Bomberg et al., 2015). Тем не менее, 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. Возможности изолировать и культивировать «глубинную» микробиоту путем применения стандартных методов также ограничены вследствие низкой численности и 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 нефтепоисковые 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 микроорганизмами с поверхности. Глубинные термальные скважины являются своеобразными «окнами» в подземный мир.

Сульфидогены, прежде всего, диссимиляционные сульфатредуцирующие прокариоты, являются одной из основных физиологических групп прокариот в 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 метабенома 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 метабеномной информации для формулирования новых сред и подбора условий для роста. Все вышесказанное подтверждает актуальность поиска, разработки новых подходов для культивирования и выделения чистых культур микроорганизмов 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 культуральную среду.

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 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 новых штаммов 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 таксономически описанных 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 глубоких скважин, могут быть использованы для выделения бактерий из глубоких 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 глубоких водоносных горизонтов на основе геномных данных. Термофильные микроорганизмы глубоких водоносных горизонтов обладают уникальными биохимическими свойствами и метаболическими путями; продуцируют ферменты, которые можно использовать в биотехнологии.

## **Личный вклад автора**

Автор принимал непосредственное участие на всех этапах работы, включая: отбор проб, выделение и культивирование микроорганизмов из подземных экосистем, 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 Международном конгрессе «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. Глухой, 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.

## 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. – 2020. – 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 разлива 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 *Thermodesulfovibrio* 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 – Р. 103.

11. 1. **Лукина А.П.**, Франк Ю.А., Карначук О.В.. Культивирование сульфидогенных микроорганизмов из воды глубоинной 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.

## ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1 Подходы к культивированию «некультивируемых» микроорганизмов

Понимание того факта, что не все микроорганизмы подвержены культивированию пришло достаточно давно. В 1898 году Генрих Винтерберг обнаружил, что количество наблюдаемых микробных клеток превышало количество колоний на питательных средах (Winterberg, 1898). Позднее Дж. Аманн количественно оценил это несоответствие и показал, что количество «нерастущих» клеток превосходило количество культивируемых почти в 150 раз (Amann, 1911). В ранней литературе несоответствие численности и культивируемой численности не раз отмечалось микробиологами (Butkevich, 1932; Butkevich and Butkevich, 1936; Cholodny, 1929). В 1985 году Дж.Т. Стэйли и А. Конопка ввели термин «большая аномалия чашечного счета» (The Great Plate Count Anomaly, GPCA) (Staley and Конопка, 1985). Упоминание «отсутствующих» при культивировании клеток было характерно для многих публикаций XX века, однако неисследованное микробное разнообразие было чисто академической проблемой, а «охота» на новые виды как ресурс для биотехнологии еще не началась (Epstein, 2009). Ошибки подсчета, мертвые клетки, а затем и поврежденные клетки постоянно считались важными компонентами несоответствия численности, наблюдаемой под микроскопом и определенной по росту на средах. Ещё со времен Коха было известно, что ни одна питательная среда не может удовлетворить требования всех микроорганизмов (Epstein, 2013), поэтому несоответствия в численности относили к несовершенству сред культивирования. Этот подход привел к тому, что существование GPCA стали рассматривать как чисто техническую проблему, которую можно решить путем улучшения состава сред и условий инкубирования (Epstein, 2009). В результате молекулярных исследований 1990-х годов стало очевидным, те микроорганизмы, которые удалось культивировать микробиологам на протяжении предыдущих веков, составляет лишь

небольшую часть того, большого «мира микробов», который еще предстояло культивировать (Lewis et al., 2010). По разным данным лишь от 0.1-1% микроорганизмов из природных биотопов являются культивируемыми, а большинство из них не поддаются культивированию при использовании стандартных методов (Staley and Konopka, 1985; Amann et al., 1995; Wade et al., 1997; Hugenholtz et al., 1998; Colwell and Grimes, 2000; Rappe and Giovannoni, 2003; Keller and Zengler, 2004; Alain and Querellou, 2009; Epstein, 2009). Карен Ллойд с соавторами проведя анализ всех доступных баз данных 16S рРНК оценили количество некультивируемых родов и филумов как  $7.3 \cdot 10^{29}$  и  $2.2 \cdot 10^{29}$  (Lloyd et al., 2018). Необходимость восполнить пробел между количеством культивированных и некультивируемых видов является актуальной практической проблемой, поскольку биотехнологическая и фармацевтическая промышленность, находясь в постоянном поиске новых терапевтических агентов и соединений (Lloyd et al., 2018). Термин «некультивируемый» вероятно был впервые использован Сюй с соавторами в 1982 г. (Xu et al., 1982) для описания голодающих, но жизнеспособных клеток в состоянии покоя. Термин также использовали для описания поврежденных клеток микроорганизмов, которые больше не способны делиться на других подходящих средах (Colwell and Grimes, 2000). Поскольку некультивируемые микроорганизмы могут расти в природных биотопах, они на самом деле не являются некультивируемыми и термин «некультивируемые» означает, что в настоящее время микроорганизм невозможно вырастить в лаборатории при доступных условиях инкубирования (Epstein, 2009).

Микробиологи, при решении проблемы «некультивируемых» организмов используют разные стратегии. Джоанна Гутлибен, GPСА используют две разные стратегии (Gutleben et al., 2018). Первая - представляет собой исследование генов «некультивируемых» видов, чтобы добыть из них информацию, которую они кодируют, или использование изотопов и электродов для измерения активности этих видов *in situ*. Вторая - это стратегия, состоящая из множества инноваций в культивировании, в основном

нацеленных на имитацию природных условий. У этих двух стратегий есть свои преимущества и недостатки, но немногие микробиологи думают, что это конкурирующие стратегии. И все чаще эти стратегии используют в симбиозе, для успешного культивирования некультивируемых микроорганизмов.

Точное количество видов бактерий и архей на планете остается нерешенным вопросом, вызывающим серьезные споры, с оценками от миллионов до триллионов (Amann and Rossello-Mora, 2016; Locey and Lennon, 2016; Schloss et al., 2016). Высокопроизводительное секвенирование открыло целый океан скрытого разнообразия микроорганизмов. Начиная с 11 бактериальных типов, описанных Вёзе в 1987 году (Woese, 1987), количество филумов неуклонно растет и большинство из них не имеет культивируемых представителей. На начало мая 2021 года в базе данных LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) насчитывают 15000 валидно описанных культивированных видов, распределенным по 59 бактериальным и 10 архейным типам (LPSN; <http://www.bacterio.net>, процитировано 3 мая 2021 г.). Формулирование и осмысление GPCA, подтолкнуло исследователей к созданию инновационных методов культивирования с использованием передовых технологий. Примером подобных технологий является: использование диффузионных камер (Epstein, 2009), микрофлюидики (Ma et al., 2014; Boitard et al., 2015), чипов для культивирования (Ingham et al., 2007; Hesselman et al., 2012; Gao et al., 2013), манипуляций с отдельными клетками (Ben-Dov et al., 2009; Park et al., 2011) и высокопроизводительное культивирование, названное «культуромикой» (Lagier et al., 2012). Диффузионная камера, созданная группой С. Эпштейна и К. Льюиса обеспечивает свободный обмен химическими веществами с внешней средой путем диффузии, ограничивая движение клеток, что позволяет выращивать микроорганизмы *in situ* в высокой плотности (Epstein, 2009). Благодаря диффузионной камере С. Эпштейна и К. Льюиса удалось культивировать ранее некультивируемую почвенную бактерию *Eleftheria terrae*, производящую тейксобактин – новый класс антибиотиков (Ling et al., 2015). Микрофлюидика в

сочетании с высокопроизводительным секвенированием накопительных культур является первым примером успешного целенаправленного выделения чистой культуры ранее некультивируемого микроорганизма семейства Ruminococcaceae из кишечника человека (Ma et al., 2014). Чипы для культивирования, являются расширением концепции диффузионной камеры С. Эпштейна и Льюиса, они позволяют быстро и эффективно культивировать микроорганизмов с ожидаемым фенотипом, а также успешно выделять микроорганизмов из консорциумов. В лабораторных условиях эксперименты по совместному культивированию редки и обычно ограничены определенными парами микроорганизмов (Ingham et al., 2007; Hesselman et al., 2012). Использование микрокапсул для культивирования в условиях *in situ* и/или *in vitro* увеличивает шансы на выделение медленно растущих микроорганизмов и образцов с низкой плотностью микроорганизмов (Ben-Dov et al., 2009). Внесение изменений в состав стандартных питательных сред, использование факторов роста, железохелатирующих сидерофоров, необычных доноров, акцепторов электронов и источников углерода успешно применяется для выделения и описания ранее некультивируемых микроорганизмов (Körke et al., 2005; Levis et al., 2010; Epstein, 2013). Диверсификация сред и мультиплицирование условий культивирования - простой способ сделать метод селективных культур более эффективным. Состав источника углерода является определяющим фактором успешного культивирования микроорганизмов. Эксперименты показывают, что использование сред с добавлением комплексных источников углерода позволяет изолировать большее разнообразие микроорганизмов, чем аналогичное применение сред с одним источником углерода. Эффективным подходом культивирования является снижение концентраций питательных веществ, благодаря этой модификации удалось изолировать '*Candidatus Pelagibacter ubique*' (Rappe et al., 2002) и некоторых других прокариот из природных сред обитания (Alain and Querellou, 2009). Большинство современных подходов разработаны для быстрорастущих микроорганизмов, поэтому для получения изолятов более ценных и редких

медленно растущих бактерий разумно увеличивать длительность времени культивирования (Buerger et al., 2012), благодаря такому подходу удалось изолировать медленно растущую асгард-архею '*Candidatus Prometheoarchaeum syntrophicum*' (Imachi et al., 2020). Уменьшение посевной площади; добавление к культуральной среде электронных транспортеров; ферментов, для нейтрализации активных форм кислорода; внесение веществ-ингибиторов, для подавления роста "нежелательных" бактерий - все эти модификации позволяют более эффективно изолировать редкие ранее некультивируемые микроорганизмы (Levis et al., 2010; Alain and Querellou, 2009). Выделение микроорганизмов, методами культуromики, демонстрируют, что часто концентрации клеток в биотопе ниже порога обнаружения молекулярными методами, это представляет серьезную проблему при метагеномных исследованиях (Lagier et al., 2012). Методы современной культуromики значительно расширили количество новых видов, введенных в культуру, включая: представителя кандидатного филума *Saccharibacteria* TM7 (He et al., 2015), '*Candidatus Atribacteria* OP9' (Katayama et al., 2020) '*Candidatus Arsenophonus arthropodicus*' (Dale et al., 2006) и др.

Высокопроизводительное секвенирование привело к росту числа композитных геномов микроорганизмов, собранных из метагеномов различных местообитаний (Gutleben et al., 2018). Однако культивирование необходимо для верификации метагеномных данных. В настоящее время культивирование микроорганизмов является наиболее надежным способом проверки экологических гипотез, основанных на данных, полученных в результате молекулярных исследований. Кроме того, культивирование необходимо для аннотации и функциональной характеристики новых генов (Muller et al., 2013). С доступными культурами метаболизм бактерий можно изучать на биохимическом уровне, выявляя пока неизвестные физиологические особенности в различных условиях инкубации. Более того, многовидовые взаимодействия, эволюционные принципы, популяционная динамика и патогенность могут быть экспериментально подтверждены только при наличии

культивируемых изолятов (Gutleben et al., 2018). Наконец, стабильные культуры открывают путь к применению их в биотехнологии, например, в открытии и производстве новых биоактивных соединений для биоремедиации и экосистемной инженерии. Фактически следует признать, что мультимиксные исследования и культивирование микроорганизмов - это две стороны одной медали (Leadbetter, 2003; Overmann, 2010).

## **1.2 Микроорганизмы подземной биосферы.**

Первые исследования микроорганизмов подземной биосферы относятся к началу 20-го века, когда Бастином в 1926 году из нефтяных резервуаров в Иллинойсе были выделены сульфатредуцирующие бактерии (Bastin et al., 1926). Исследователи рассматривали наличие биоразлагаемой нефти в нефтяных коллекторах как доказательство существования активных микробных сообществ в глубоких недрах. Однако эти находки не вызывали особого доверия со стороны научного сообщества, а полученные данные, подтверждающие наличие «подземной жизни» оппоненты группы Бастина объясняли загрязнением образцов при отборе проб. Позднее, в 1930-х годах, микробиологические исследования морских отложений продемонстрировали существование жизни в океанических недрах (ZoBell, 1938; ZoBell and Anderson 1936). Концепция жизни на больших глубинах в корне изменилась после открытия подземных гидротермальных вентов, где первичная продукция в отсутствие света основана на хемосинтезе (Corliss et al., 1979). Гйорш и Вилсон, обсуждая исследования жизни в глубинных горизонтах в 1988, указывали на значительную неопределенность, связанную с возможным загрязнением с поверхности во время отбора проб (Ghiorse and Wilson 1988). В связи с этим была разработана целая система меток возможного загрязнения во время отбора проб (Kieft, 2010). Томас Голд был одним из первых, кто высказал предположение о существовании в континентальных недрах экосистем, независимых от фотосинтеза. Голд рассматривал не только подземные

местообитания как возможную среду обитания для микроорганизмов, но и возможность того, что жизнь может быть найдена на других планетах (Gold, 1992).

Доступ к глубоким подземным экосистемам можно получить через своеобразные «окна», естественные и искусственные (Escudero et al., 2018). К ним относятся артезианские скважины (Chapelle et al., 2002; Stevens and McKinley 1995), родники (Magnabosco et al., 2014; Probst et al., 2014; Suzuki et al., 2013), подземные площадки для захоронения радиоактивных отходов (Pedersen, 1999), подземные исследовательские объекты (Momper et al., 2017; Murakami et al., 2002) или глубокие шахты (Onstott et al., 2003; Sahl et al., 2008). В последнем случае, например, вместо использования крупногабаритного оборудования для бурения с поверхности и образцы могут быть отобраны со стен шахты. Однако следует иметь в виду, что изучение подземной биосферы через «искусственные окна» основано на системах, которые во многих случаях были ранее модифицированы человеком (иногда за годы до отбора проб), и, следовательно, они представляют собой нарушенную среду, где популяции микробов могут не отражать естественное для местных микробимов сообщество. Большинство исследовательских групп сосредотачивают свое внимание на изучении подземных вод, поскольку отобрать и проанализировать воду намного проще, чем пробы твердых пород из пробуренных скважин (Escudero et al., 2018). Поэтому, данные полученные на сегодняшний день из подземных исследований преимущественно относятся к описанию планктонной жизни. По расчетам некоторых авторов, количество микроорганизмов, ведущих прикрепленный образ жизни, на три порядка больше, чем планктонный (McMahon and Parnell, 2014), в связи с этим подавляющее большинство микроорганизмов подземной биосферы остаются не изученными.

Существует общее мнение, что *in situ* подповерхностные микроорганизмы полагаются на ограниченные источники энергии, имеют низкие скорости метаболизма и очень длительное время генерации, от сотен до тысяч лет (Labonté et al., 2015). Согласно последним оценкам, биомасса континентальных

подповерхностных водоносных горизонтов составляет 23–31 Пг углерода или от 12 до 20% общей биомассы микроорганизмов на Земле (Magnabosco et al., 2018). Глубоководные и наземные подповерхностные среды обитания содержат множество функционально активных микробных сообществ, существование которых ограничивается только повышением температуры с глубиной, достигая предела на глубине 3–5 км (Ghiorse and Wilson, 1988; Parkes et al., 2000; Takai et al., 2001; Teske, 2005; Itävaara et al., 2011; Lomstein et al., 2012; Bomberg et al., 2015). Глубинные микробные сообщества могут не зависеть от поступления органического вещества с поверхности и автономно существовать в течение сотен миллионов лет (Chivian et al., 2008; Edwards et al., 2012). Прокариоты глубинных экосистем (Archaea and Bacteria) способны выжить при очень ограниченном потоке энергии (~ в 1000 раз ниже, чем требуется для лабораторных культур, Hoehler and Jorgensen, 2013). В зависимости от типа пород подземные микробные сообщества могут быть литоавтотрофными или органотрофными (Fredrickson and Hicks, 1987). В литоавтотрофных сообществах, характерных для магматических пород, основным источником энергии является молекулярный водород абиотического происхождения, а содержание органического углерода крайне низкое (Moser et al., 2005; Chivian et al., 2008). Геологические источники  $H_2$  и абиотического  $CH_4$  сыграли решающую роль в эволюции нашей планеты, а также в развитии жизни и устойчивости подземной биосферы.  $H_2$  и  $CH_4$  являются важными источниками энергии и углерода, поддерживающими обитаемость крупнейшей среды обитания микробов на Земле, подземной биосферы (Colman et al., 2017). Способность метаболизировать  $H_2$  широко распространена в мире микробов, около 30% таксонов с доступными геномами кодируют [FeFe]-, [NiFe]-гидрогеназу или [Fe]-гидрогеназу, основные ферменты, участвующие в метаболизме  $H_2$  (Peters et al., 2015).

В осадочных породах органическое вещество, захороненное с момента их образования, обеспечивает энергией и органическим углеродом различных органотрофных микроорганизмов. Наиболее изученным примером таких

экосистем являются пластовые воды нефтяных резервуаров, в которых обитают разнообразные сообщества бактерий и архей (Orphan et al., 2003; Lewin et al., 2014; Hu et al., 2016).

В земных недрах доноры электронов, полученные в результате фотосинтеза, находятся в относительно небольшом количестве, а геогенные газы  $H_2$  и  $CH_4$  являются источниками энергии для микробных сообществ (Haveman and Pedersen, 2002). Геогазы поддерживают существование автотрофных метаногенов, ацетогенов, а также железо- и сульфатредуцирующих прокариот (Haveman and Pedersen, 2002; Chivian et al., 2008; Pedersen, 2013; Nyuysönen et al., 2014; Purkamo et al., 2015; HERNSDORF et al., 2017; Bell et al., 2018; Ino et al., 2018; Boylan et al., 2019). В то время как автотрофные микробные сообщества, потребляющие водород, часто являются преобладающими, было показано, что гетеротрофные организмы вносят вклад в биогеохимические циклы в подповерхностных слоях, разрушая трудноразлагаемое органическое вещество и микробную некротому (Purkamo et al., 2015; Wu et al., 2016; Bell et al., 2018).

### 1.2.1 Сульфидогены в подземной биосфере

Сульфатредуцирующие прокариоты (СРП) являются важным компонентом земных недр и часто служат доминирующей метаболической группой в биотопах, где присутствует сульфат (Wu et al., 2016; Bell et al., 2018; Boylan et al., 2019). Однако в условиях невысоких концентраций сульфата, исследователи часто обнаруживают СРП в подземных биотопах (Purkamo et al., 2015; HERNSDORF et al., 2017). Акцепторы электронов с более высоким потенциалом для восстановления, такие как нитрит, нитрат и кислород, обычно истощаются глубоко под поверхностью (Orcutt et al., 2011). Несмотря на ограниченную доступность, метаболический потенциал для восстановления нитратов был обнаружен в подземных водах Финляндии (Rajala et al., 2015; Bell et al., 2018), денитрификаторы также были идентифицированы в серу-содержащих флюидах из бассейна Витватерсранд, Южная Африка (Lau et al., 2016).

Микробная диссимиляционная сульфатредукция (ДСР) является основным двигателем современного цикла серы и важным участником углеродного цикла (Rabus et al., 2013, 2015; Chernyh et al., 2019). Сульфатредуцирующие микроорганизмы или сульфатредуцирующие прокариоты (СРП) представляют собой полифилетическую группу анаэробных микроорганизмов, состоящую из сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) и сульфатредуцирующих архей. СРП в ходе анаэробного дыхания используют сульфат ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) в качестве конечного акцептора электронов, восстанавливая его до сероводорода ( $\text{H}_2\text{S}$ ) (Muyzer and Stam, 2008; Rabus, et al., 2015). Сульфатредукторы также могут расти без сульфата, а в некоторых случаях они растут только в синтрофной ассоциации с метаногенами или другими микроорганизмами потребляющими водород (Plugge et al., 2011). Помимо сульфата сульфатредуцирующие микроорганизмы способны восстанавливать другие окисленные неорганические соединения серы, такие как сульфит ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), дитионит, тиосульфат ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ), тритионат ( $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$ ),

тетратионат ( $S_4O_6^{2-}$ ), элементарная сера ( $S_8$ ) и полисульфиды ( $S_n^{2-}$ ). Некоторые представители СРП способны к восстановлению нитратов и нитритов до аммония ( $NO_2^-$  и  $NO_3^- \rightarrow NH_4^+$ ), селената до селенита ( $SeO_4^{2-}$  переходит в  $SeO_3^{2-}$ ), фумарата до сукцината ( $C_4H_4O_4 \rightarrow C_4H_6O_4$ ).

### **1.2.2 Геохимическая роль сульфатредуцирующих бактерий в глубинных подземных местообитаниях**

Несмотря на то, что биогеохимические циклы координируются комплексом живых организмов и абиотических факторов, микроорганизмы играют ключевую роль, а иногда даже уникальную, в их регуляции во всех средах нашей планеты. Метаболические процессы микроорганизмов эффективно контролируют биогеохимический круговорот веществ. Микробы составляют основу любой экосистемы, особенно в которых отсутствует свет (Gadd, 2010; Rousk and Bengtson, 2014; Graham et al., 2016).

Микробы обладают целым рядом свойств, которые могут влиять на изменение токсичности и подвижности металлов, на образование минералов или их растворение (Gadd, 2010). Исследование влияния микроорганизмов на судьбу полезных ископаемых и геологически значимых соединений может привести к пониманию биогеохимических циклов. Метаболическая активность микроорганизмов может служить причиной растворения минералов и приводить к образованию кислых дренажей (особенно при окислении пирита), что в свою очередь, приводит к загрязнению окружающей среды тяжелыми металлами. С другой стороны, метаболизм микроорганизмов способствует образованию рудных месторождений, микробы играют ключевую роль в минерализации веществ (Haferburg and Kothe, 2007).

Серу - необходимый элемент для жизни, микроорганизмы играют важную роль в рециркуляции соединений серы. Крупнейшие резервуары серы на Земле: месторождения сульфида железа – пирита ( $FeS_2$ ), гипса ( $CaSO_4$ ), отложения и породы ( $7.8 \cdot 10^{18}$  г серы), и сульфат в морской воде ( $1.28 \cdot 10^{18}$  г серы) (Muzyer

and Stams, 2008). Микробы взаимодействуют с металлами и минералами в природных и синтетических средах, изменяя их физическое и химическое состояние, но при этом металлы и минералы также могут влиять на рост, активность и выживание микроорганизмов (Gadd, 2010). Другим способом взаимодействия микроорганизмов с металлами является их восстановление в ходе анаэробного дыхания - повсеместный биогеохимический процесс в бескислородных и подповерхностных средах (Badalamenti et al., 2016).

Восстановление соединений серы, в частности, сульфатов, под действием СРП как в поверхностных, так и в глубинных экосистемах приводит к образованию высокорекреационного  $H_2S$ , который может связывать металлы в нерастворимые сульфиды. Данный процесс является основой экобиотехнологий достаточно давно, однако, некоторые аспекты этого процесса так и остаются неизученными (Barton and Hamiton, 2007). Общее уравнение образования нерастворимых сульфидов металлов в результате сульфатредукции имеет следующий вид (Barton and Hamiton, 2007):



где а – сульфатредукция, б и в – образование нерастворимых сульфидов металлов в ходе сульфатредукции, а  $CH_2O$  – органический субстрат.

Биоминералы имеют глобальное геологическое и промышленное значение. Вездесущность и важность микробов в биосферных процессах делает геомикробиологию одной из самых важных отраслей микробиологии. Сульфидные минералы играют ключевую роль в биогеохимическом цикле серы в анаэробных средах. Образование сульфидов приводит к осаждению металлов в почвах – это основной механизм формирования сульфидных рудных месторождений (Gramp et al., 2006). Считается, что способность микроорганизмов катализировать окислительно-восстановительные превращения серы и железа оказала большое влияние на эволюцию нашей

планеты (Osorio et al, 2013). За последнее десятилетие глубинные экосистемы были описаны как ключевой компонент глобального цикла углерода. Однако экологические данные о подземных средах все также остаются ограниченными, главным образом из-за трудностей отбора проб (Añillo et al., 2016). Некоторые биоминералы, осаждаемые микробами, обладают каталитическими и другими свойствами в наночастицах, кристаллических или коллоидных формах, и они имеют отношение к разработке новых биоматериалов для технологических и антимикробных целей (Gadd, 2010).

## Глава 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Объекты исследования

Для проведения исследований были использованы пробы глубинных термальных вод скважин 1-Р и 5-Р, отобранных на территориях Томской области в 2013-2018 гг, и микробные обрастания, развивающиеся на устьях скважин Г-1 и Р-1 в республике Бурятия, отобранных в 2016 г.

Скважина 1-Р расположена в поселке Белый Яр в Томской области. Скважина была пробурена в 1961 – 1962 гг на глубину 2.56 км. Пробы воды глубинной скважины 1-Р отбирали несколько раз в течение 2013–2018 гг.

Скважина 5-Р расположена в селе Чажемто, Томской области. Скважина пробурена в 1957 г на глубину 2.79 км. Отбор проб термальной воды скважины 5-Р проводили в 2015 г и 2019 г.

Также в данном исследовании использовали микробные обрастания, формирующиеся на выходе глубинных вод из артезианских термальных скважин в Тункинском районе, республика Бурятия, для получения культур сульфатредуцирующих спорообразующих прокариот.

Нефтепоисковая скважина Г-1 пробурена в 1988 году. В настоящее время термальная вода поступает с горизонта 834–864 м и используется для лечебных целей. Пробы из воды скважины и матов в местах стока термальной воды у основания обсадной трубы отбирали 05.08.2016 г.

Скважина Р-1 была пробурена в 1953–1954 гг. до глубины 834 м. Скважина изливается непосредственно в небольшой термальный бассейн. Обсадная труба скважины покрыта массивными микробными обрастаниями черного цвета. Пробы воды и микробных обрастаний отбирали 05.08.2016 г.

Физико-химические характеристики проб воды и описание мест отбора приведены в главе результаты (таблица 1).

## **2.2. Методы отбора проб подземной воды и определение физико-химических параметров**

Образцы воды и микробных обрастаний (матов), предназначенные для культивирования, отбирали в стерильные флаконы объемом 50 мл. Температуру, рН и окислительно-восстановительный потенциал воды измеряли на месте отбора проб рН-метром HI8314F (Hanna Instruments Deutschland, Vöhringen) и соответствующими электродами.

Для измерения концентрации  $H_2S$  пробы воды сразу фиксировали на месте излива скважин 2.4 % ацетатом цинка. Концентрацию сероводорода измеряли колориметрически, методом метиленового синего (Cline, 1969) в трех повторностях с использованием спектрофотометра Smart Spec Plus (Bio-Rad Лаборатории, Геркулес, Калифорния, США) и UV-2600 (Shimadzu Corporation, Япония).

Элементный состав воды определяли методом масспектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ISP-MS) в ХАЦ "ПЛАЗМА" (г. Томск). Образцы воды для химического анализа фильтровали через стерилизующий фильтр-насадку Millipore с размером пор 0.22 мкм в стерильные флаконы объемом 50 мл.

## **2.3 Культивирование сульфидогенов**

Для культивирования накопительных и чистых культур сульфидогенных микроорганизмов использовали основную среду Видделя-Бака (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. Среду стерилизовали автоклавированием, в течение 30 мин при 121 °С. Перед посевом анаэробных сульфидогенных микроорганизмов стерильную основную среду Видделя-Бака кипятили в около минуты и затем быстро охлаждали под струей холодной воды. К основной среде в асептических условиях добавляли растворы (мл/л):

раствор витаминов, 2; раствор микроэлементов, 1; раствор кофакторов (селенит-вольфрамата), 1; субстрат роста; раствор восстановителя - сульфид натрия ( $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ), 2; акцептор электронов; после чего доводили pH среды до заданного значения. Затем готовую основную среду разливали по стерильным пенициллиновым флаконам и/или сывороточным бутылкам (120-500 мл) с добавлением железных скрепок ( $100\% \text{Fe}^0$ ), железо использовали в качестве дополнительного источника железа и для поддержания низкого окислительно-восстановительного потенциала за счет производства катодного водорода. Заполненные сосуды закрывали стерильными резиновыми пробками, притирая их с помощью стерильной иглы, для полного удаления газовой фазы и избытка питательной среды. Пробки фиксировали алюминиевыми колпачками. Инокулят в объеме 10-30% вносили стерильным одноразовым шприцем.

Раствор витаминов (г/л): парааминобензойная кислота, 0.05; биотин, 0.01; никотиновая кислота, 0.025; кальция пантотенат, 0.01; пиридоксин дигидрохлорид, 0.15; цианкобаламин, 0.05; тиамин, 0.1; рибофлавин, 0.005; фолиевая кислота, 0.002. Готовый раствор витаминов дважды фильтровали в стерильные стеклянные флаконы, используя фильтры-насадки с диаметром пор 0.22 мкм. Раствор нехелатных микроэлементов (Widdel, Bak, 1992): дистиллированная вода, 987 мл; HCl (7.7 M), 12.5 мл;  $\text{FeSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2.1 г;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.03 г;  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 г;  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.19 г;  $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.024 г;  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.002 г;  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.144 г;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.036 г; раствор автоклавировали в течение 20 мин при 121 °C. Растворы селенит-вольфрамата: дистиллированная вода 1 л; NaOH – 4 г;  $\text{Na}_2\text{SeO}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0.006 г;  $\text{Na}_2\text{WO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.008 г. Раствор кофакторов автоклавировали в течение 20 мин при 121 °C. Раствор сульфида натрия: 48 г  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  растворить в 1 л дистиллированной воды; анаэробно под током 100% бескислородного  $\text{N}_2$  разлить в пробирки и автоклавировать 20 мин при 121 °C. Растворы для регулирования значения pH: 1M  $\text{NaHCO}_3$ ; 2M и 4M NaOH; 1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; 2M HCl. Растворы для pH автоклавировали в течение 20 мин при 121 °C.

## 2.4 Культивирование анаэробных микроорганизмов

Для получения первоначальной накопительной культуры термофильной спирохеты использовали модифицированную пресную среду Видделя-Бака (Widdel, Bak, 1992), следующего состава (г/л):  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0.15;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.25;  $\text{NaCl}$ , 1;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.4;  $\text{KCl}$ , 0.5;  $\text{CaCl}_2$ , 0.113. Перед посевом анаэробных микроорганизмов стерильную среду кипятили около минуты и затем быстро охлаждали под струей холодной воды. К модифицированной пресноводной среде Видделя-Бака в асептических условиях добавляли растворы (мл/л): витаминов, 2; микроэлементов, 1; кофакторов (селенит-вольфрамата), 1; субстрат роста – мальтоза, 10 мМ; раствор восстановителя - сульфид натрия ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ), 2. Значение рН в накопительной культуре доводили раствором гидрокарбоната ( $\text{NaHCO}_3$ ) в соответствии со значением рН на изливе скважины. Состав раствор витаминов, кофакторов и восстановителя описан ранее в главе 2.3.

Для культивирования термофильных спирохет из скважин 1-Р и 5-Р, Томской области, разработали базальную среду, следующего состава (г/л):  $\text{NaNO}_3$ , 2;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1;  $\text{MgSO}_4$ , 0.5;  $\text{KCl}$ , 0.5;  $\text{FeSO}_4$  0.01; дрожжевой экстракт, 1. Перед посевом анаэробных микроорганизмов стерильную среду кипятили около минуты и затем быстро охлаждали под струей холодной воды. К базальной среде в асептических условиях добавляли растворы (мл/л): витаминов, 20; раствор микроэлементов SL-10, 1; раствор кофакторов (селенит-вольфрамата), 1; субстрат роста; восстановитель - сульфид натрия ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ), 5; после чего доводили рН среды до заданного значения. Затем готовую базальную среду разливали по стерильным пенициллиновым флаконам и/или сывороточным бутылкам (120-500 мл); для культивирования штамма NS в пенициллиновые флаконы добавляли активированный уголь, а для штамма N5R железные скрепки (100%  $\text{Fe}^0$ ).

Раствор микроэлементов SL-10: дистиллированная вода, 990 мл; HCl (7.7 M) 10 мл; FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1.5 г; ZnCl<sub>2</sub>, 0.07 г; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.1 г; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.006 г; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.19 г; CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.002 г; NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.024 г; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.036 г; раствор автоклавировали в течение 20 мин при 121 °С.

## 2.5 Изучение морфологии, физиологии и таксономии чистых культур

Чистые культуры получали путем выделения единичных колоний на твердой основной среде, в качестве отвердителя использовали термостабильный полисахарид Gelzan<sup>™</sup> (Gelrite<sup>®</sup>, Sigma). Также использовали метод предельных разведений на жидкой среде Видделя. Для выделения спорообразующих сульфидогенных бактерий применяли пастеризацию.

Для посева на твердую среду, основную среду переводили в жидкое состояние, нагревая на водяной бане, вносили добавки, охлаждали до 40 °С, разливали в стерильные пробирки объемом 20 мл и закрывали резиновыми пробками, притирая их стерильной иглой. Колонии черного цвета (из-за образующегося сульфида железа) выделяли из столбика агара после переноса его в стерильную чашку Петри. Все процедуры проводили на специальном устройстве с источником света, направленным на столбик агара.

Для исследования особенностей физиологии чистых культур, в качестве доноров электронов, использовали следующие органические соединения (конечная концентрация, mM): сукцинат, 4.5; лактат, 7.3; малат и формиат, 7.5; пируват и бутират, 7; ацетат и фумарат, 9; пропионат, 13.5; бензоат, 2.5; пальмитат, 1; цистеин, 0.011; аланин, 0.008; сахароза, 3; фруктоза и глюкоза, 5; этанол 25; пропанол, 17; изобутанол 13.5; глицерин, 11. Приготовление растворов акцепторов электронов для культивирования сульфидогенов (конечная концентрация, mM): сульфит натрия, 2 и 20; тиосульфат натрия, 20; фумарат, 10; нитрит натрия, 2; нитрат кальция, 0.4 и 5; Fe (III)-НТА, 20 mM; элементная сера, 2%.

Растворы полиаминов: спермидин (Spermidine, BioChemica PanReac AppliChem, 99%),  $10^{-4}$  М, раствор стерилизуют фильтрованием, спермидин со временем дезаминируется, поэтому раствор следует хранить замороженным.

Чистоту выделенных сульфидогенных культур проверяли (1) микроскопически, с использованием фазово-контрастного микроскопа Zeiss AxioStar (Carl Zeiss, Германия); (2) по отсутствию роста в аэробных условиях на твердой питательной среде Plate Count Agar (на чашках Петри): дистиллированной воды, 1 л; декстрозы, 1 г; триптона, 5 г; дрожжевого экстракта, 2.5 г; и в анаэробных условиях на твердой среде Anaerobic Agar (г/л): казеина, 5; дрожжевого экстракта, 2.5; декстрозы, 1; (3) путем разделения фрагментов гена 16S рНК, амплифицированных из культур, в денатурирующем градиенте (ПЦР-ДГГЭ).

Для определения предельных и оптимальных значений температуры чистые культуры бактерий выращивали на основной среде с добавлением оптимального донора и акцептора электронов, культуры предварительно адаптировали к исследуемому значению температуры, посредством 3 посевов. Удельные скорости роста определяли по наклону полулогарифмического графика, полученного в экспоненциальной фазе роста. Графики роста строили по изменению количества клеток в культуральной жидкости в динамике, количество клеток определяли методом прямого счета, подсчет вели в трех повторностях.

Для определения пределов роста и оптимальных значений рН штаммы сульфидогенных организмов культивировали на основной среде с добавлением оптимального донора и акцептора электронов, и оптимальной температуре (°С). рН основной среды доводили растворами  $H_2SO_4$  (1М),  $NaHCO_3$  (1М) или  $NaOH$  (1М и 4М). Карбонатный буфер удалили из питательной среды, как было рекомендовано для культивирования чистых культур ацидофильных СРБ (Sánchez-Andrea et al., 2015).

Удельные скорости роста определяли по наклону полулогарифмического графика, полученного в экспоненциальной фазе роста. Графики роста строили по изменению количества клеток в культуральной жидкости в динамике, подсчет вели в 30 полях, в трех повторностях.

Для определения предельных и оптимального значения солености чистые культуры СРБ выращивали в оптимальных условиях с добавлением к основной среде натрия хлорида (NaCl). Культуру предварительно адаптировали для роста на различных значениях NaCl (0-5%). После серии пересевов проводили подсчет клеток в 30 полях, в 3-х повторностях.

Изучение морфологии, физиологии и таксономии чистых культур проводили с помощью фазово-контрастной и трансмиссионной (просвечивающая) электронной микроскопии.

Микроскопический анализ и подсчет клеток сульфидогенных микроорганизмов проводили с помощью фазово-контрастной микроскопии на микроскопе Axio Star (Carl Zeiss, Германия). Микрофотографии получали с помощью микроскопа Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) с цифровой камерой Axio Cam HRC и программным обеспечением Axio Vision. Для подсчета клеток брали аликвоту культуры объемом 2 мкл переносили на предметное стекло и накрывали покровным стеклом размером 18 x 18 мм. Подсчет клеток осуществляли в тридцати полях зрения. Для расчета среднего количества клеток в 1 мл использовали формулу:

$$x = \frac{1000}{S_{пз} * \frac{V_{пр}}{S_{ст}}} * n$$

где:

x – количество клеток в 1 мл исследуемой пробы;

S<sub>пз</sub> – площадь поля зрения микроскопа (1.43 мм<sup>2</sup>);

S<sub>ст</sub> – площадь покровного стекла (324 мм<sup>2</sup>);

Vпр – объем пробы взятой для анализа (2 мкл);

n – среднее количество клеток в поле зрения (по 30 измерениям).

Микроскопические исследования ультратонких срезов клеток проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) с помощью электронного микроскопа JEM-100B (Jeol, Япония) при 80 кВ по методике, описанной Карупу (Карупу, 1984). Первоначально избавлялись от частиц сульфидов, мешающих получению срезов клеток. Для этого культуральную жидкость перемешивали на вортексе 5 мин, после содержимое переносили в центрифужную пробирку (50 мл) и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 2 мин, для удаления крупных частиц осадка (сульфида железа). Затем супернатант переносили в чистую центрифужную пробирку и центрифугировали при 11000 об/мин в течение 20 мин, надосадочную жидкость сливали. Препараты готовили по методике Уикли (Уикли, 1975). Клетки фиксировали 2.5% раствором глутарового альдегида в 0.1 М какодилатном буфере (pH 7.4), после чего обрабатывали 1% раствором OsO<sub>4</sub> и двукратно промывали какодилатным буфером. Затем препарат обезвоживали в серии спиртовых растворов возрастающей концентрации. Дегидратированные препараты заливали смесью смол Embed 812 (Epon-812) (Undeen, 1997). Полимеризацию проводили при 60 °С в течение 2 суток. Срезы препаратов толщиной 60–100 нм готовили с помощью микротомы Ultrotome III (LKB, Швеция). Затем срезы переносили на формваровые сетки-подложки и окрашивали 2% раствором уранилацетата в 50% этиловом спирте в течении 10-20 мин при 37 °С, а после цитратом свинца при комнатной температуре от 3 до 10 мин (Reynolds, 1963).

Таксономическое положение полученных штаммов микроорганизмов определяли молекулярно-биологическими методами. Для выделения ДНК клетки из накопительных и чистых культур собирали центрифугированием в течение 30 мин при 11000 об/мин. в центрифуге с охлаждением Eppendorf 5804R. Тотальную ДНК из культур СРБ выделяли с использованием набора МО

BIO Power Soil DNA Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) в соответствии с рекомендациями производителя. Амплификацию гена 16S рРНК проводили с помощью пары праймеров 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (DeLong, 1992; Weisburg et al., 1991), как было описано ранее (Карначук и соавт., 2009). Для подготовки образцов к разделению в денатурирующем градиенте проводили реамплификацию фрагментов гена (около 600 п.н.) с праймерами BacV3f (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') и 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTGAGTTT-3') (Weisburg et al., 1991). При этом праймер BacV3f содержал GC-последовательность на 5'-конце. ПЦР-продукты, полученные с праймерами 27F и 1492R и разведенные до концентрации ДНК около 50 нг/мкл, использовали в качестве матрицы ДНК во второй реакции. ПЦР смесь (объемом 50 мкл) содержала 5 мкл 10xTaq-буфера (Fermentas, Литва), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Литва), 100 мкМ смеси dNTP (Fermentas, Литва), 1.25 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas, Литва), 0.2 мкМ каждого праймера (ЗАО «Синтол», Москва). Реакцию проводили в амплификаторе MyCycler (BioRad). В качестве положительного контроля использовали реакционную смесь с ДНК, которая ранее успешно амплифицировалась. Отрицательным контролем была реакционная смесь, не содержащая ДНК. Визуализацию продуктов амплификации осуществляли в 1% агарозном геле с использованием горизонтальной камеры для электрофореза Mini-Sub Cell GT System (BioRad). Образцы окрашивали бромистым этидием, который добавляли в гель в концентрации 0.5 мг/л.

## **2.6. Материаловедческий анализ осадков**

Изучение возможной геохимической деятельности изолятов СРБ проводили с помощью исследования образованного ими в различные временные отрезки осадка. Полученный осадок анализировали, используя сканирующую электронную микроскопию с энергодисперсионным анализом

(SEM-EDS) и дифракционный анализ (XRD). Пробоподготовка включала: (1) осаждение осадка с помощью центрифугирования (5 мин 10000 об/мин); (2) высушивание осадка. Высушенные осадки хранили в атмосфере азота при комнатной температуре. Порошкообразный осадок наносили тонким слоем на двухсторонний скотч и устанавливали на подложку. Элементный анализ образца проводили с помощью ионного микрозонда энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDS), прикрепленного к сканирующему электронному микроскопу Philips SEM 515. Сканирующие электронные микроснимки были сняты при ускоряющем напряжении 30 кВ, фокальное расстояние 12 мм и размер зонда 50-100 нм (Ikkert et al., 2013). Минералогический состав осадков определяли с помощью рентгеновского дифракционного анализа (XRD) с использованием дифрактометра Shimadzu XRD 6000, с  $\text{CuK}\alpha$  - излучением. Идентификация минералов проводилась с помощью компьютера с базой данных PDF-2 (Ikkert et al., 2013).

Для изучения осаждения железа под действием чистых культур СРБ, растущих в сывороточных флаконах (120 мл) на среде WB добавляли железо  $\text{Fe}^{2+}$  (100 мг/л и 1 г/л) при различных значениях pH. Образование сульфидов железа штаммами *Thermodesulfovibrio* sp. N1, sp. V2, и '*Desulforudis audaxviator*' sp. ВУФ оценивали в различные временные отрезки (16 и 26 суток) в 3х параллельных повторностях. Элементный состав осадков анализировали с помощью сканирующей электронной микроскопии с энергодисперсионным анализом (СЭМ-ЭДС), а кристаллическую фазу исследовали с помощью рентгенофазового анализа (XRD).

## **2.7. Аналитические методы исследования и статистическая обработка данных**

Количественное содержание элементов в пробах воды определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS).

Пробы воды анализировали в химико-аналитическом центре «Плазма» (г. Томск).

Для определения концентрации сероводорода использовали колориметрический метод с N,N-диметил-п-фенилендиамином (Cline, 1969). В мерную колбу на 25 мл вносили 5 мл раствора 2.4% ацетата цинка ( $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  – 24 г, 20% уксусная кислота – 1 мл, дистиллированная вода до 1 л); добавляли 1 мл исследуемого раствора, в контроль, вместо исследуемого раствора, вносили дистиллированную воду; далее вносили 5 мл дистиллированной воды и 2.5 мл диаминового реактива (дистиллированная вода – 600 мл, серная кислота 98% – 200 мл, N,N-диметил-1,4-фенилендиаммоний хлорид – 2 г, дистиллированная вода до 1 л); хорошо перемешивали и добавляли 0.125 мл железоаммонийных квасцов ( $NH_4Fe(SO_4) \cdot 12H_2O$  – 10 г, серная кислота 98% – 2 мл, дистиллированная вода до 1 л), перемешивали. Оставляли в темном месте на 15 мин. Затем доводили объем дистиллированной водой до 25 мл, перемешивали и измеряли оптическую плотность при длине волны 670 нм. Концентрацию сероводорода рассчитывали по формуле:

$$x=(a-b) \cdot k,$$

где  $a$  – оптическая плотность в образце,  $b$  – оптическая плотность в контроле,  $k$  - коэффициент, рассчитанный с помощью калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой использовали растворы сульфида натрия ( $Na_2S \cdot 9H_2O$ ) известной концентрации.

Статистический анализ данных был выполнен с помощью пакетов программного обеспечения MS Excel 2010.

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. Физико-химическая характеристика проб воды

Отбор проб воды на скважине 1-Р проводили в августе 2013 г., а так же в августе 2014 г. и июле 2018. Скважина 1-Р расположена в поселке Белый Яр Верхнекетского района Томской области. Скважина пробурена в 1961-1962 годах на глубину 2.56 км. Однако точный горизонт, из которого поступает вода, в настоящее время не известен (Podosokorskaya et al., 2013). Температура воды скважины 1-Р варьирует от 38 °С до 45 °С, рН воды слабощелочной 7.9 – 8.5. На момент отбора проб 03.07.2018 г. температура составляла 43.3 °С, рН=8.5, E<sub>h</sub> = -443 мВ, концентрация сероводорода (H<sub>2</sub>S) составляла 1.97 ± 0.27 мг / л.

Отбор проб воды скважине 5-Р проводили в сентябре 2015 г. и июле 2019 г. Скважина расположена в пос. Чажемто, Томской области. Скважина пробурена в 1957 г. на глубину 2.79 км. Температура воды на выходе колебалась от 14.5 до 20.8 °С, окислительно-восстановительный потенциал от -329 до -680 мВ и имела нейтральный рН (7.5-7.6). На момент отбора проб 11.07.2019 г. температура воды составляла 14.5 °С, рН 7.5 и E<sub>h</sub> -420 мВ. Концентрация H<sub>2</sub>S была 3.46 ± 0.47 мг/л.

Пробы воды и микробных обрастаний скважин Г-1 и Р-1 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 XX в. В настоящее время термальная вода поступает с горизонта 834–864 м и используется для лечебных целей. В момент отбора проб воды и микробных матов температура воды составляла 54.8 °С, рН 6.75, низкий окислительно-восстановительный потенциал, -238 mV, свидетельствовал о восстановленных условиях (таблица 1). Вода имела выраженный запах сероводорода, концентрация которого составляла 0.93 мг/л (таблица 2).

Таблица 1. Физико-химическая характеристика скважин / проб

№ скважины/ обозначение пробы	1-Р	5-Р	Г-1 / Ву 1-1	Р-1 / Ву 2-2
Характеристики				
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
рН	8.3	7.43-7.6	6.75	8.06
Eh, mV	-279 -341	-304 -420	-238	-586
H <sub>2</sub> S, мг/л	0.64-0.88	48.7	0.933	0.930

Скважина Р-1 была пробурена в 1953–1954 гг. до глубины 834 м. Вода скважины используется для бальнеологических целей. Скважина изливается непосредственно в небольшой термальный бассейн. Обсадная труба скважины покрыта массивными микробными обрастаниями черного цвета. Температура воды скважины Р-1 в момент отбора проб составляла 39.7 °С, рН 8.06. Вода была сильно восстановлена ( $E_h = -386$  mV) и содержала следы сероводорода - 0.93 мг/л (таблица 1, 2).

Таблица 2. Элементный состав воды скважин

Скважина / проба	1-Р	5-Р	Г-1 (Бу 1-1)	Р-1 (Бу 2-2)
Параметры				
Содержание в воде, мг/л:				
Na	656	1970	985	311
Mg	0.14	1.06	184	4.46
Ca	9.4	246	168	22.4
Si	12.9	15.24	100	18.3
K	3.14	13.9	39.5	2.80
Sr	0.001	15.8	6.17	0.31
B	2.27	6.13	4.70	< 0.002
Li	0.046	0.281	2.98	0.006
Fe	0.097	0.94	0.87	0.27
Ba	0.227	4.15	0.22	0.063
Se	< 0.1 · 10 <sup>-3</sup>	0.0246	0.20	0.005
P	< 0.01	< 0.07	0.099	0.020
Rb	0.004	0.0281	0.095	< 0.002
Mn	0.008	0.0394	0.087	0.065
Sc	-	< 0.002	0.037	-
Al	0.014	0.0049	0.024	0.018
Ge	-	0.0292	0.019	0.39 · 10 <sup>-3</sup>
Zn	0.8 · 10 <sup>-3</sup>	< 0.002	0.012	0.012
Cr	< 5 · 10 <sup>-4</sup>	0.00205	0.009	0.011
As	0.49 · 10 <sup>-3</sup>	0.0295	0.004	< 0.002
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	< 5	23.28	< 10	< 10
H <sub>2</sub> S	0.64±0.35	48.7±6.53	0.93±0.37	0.93

### 3.2 Выделение и изучение новых *Thermodesulfovibrio* spp.

Представители рода *Thermodesulfovibrio*, филума Nitrospirae, судя по молекулярным данным, опубликованным в литературе, широко распространены в подземной биосфере. Специфические нуклеотидные последовательности представителей рода *Thermodesulfovibrio* были обнаружены в воде глубинных водоносных горизонтов нефтепоисковых скважин 1-Р и 5-Р в Томской области (рис. 1; Kadnikov et. al., 2018). Поэтому были предприняты попытки культивирования представителей этого рода.

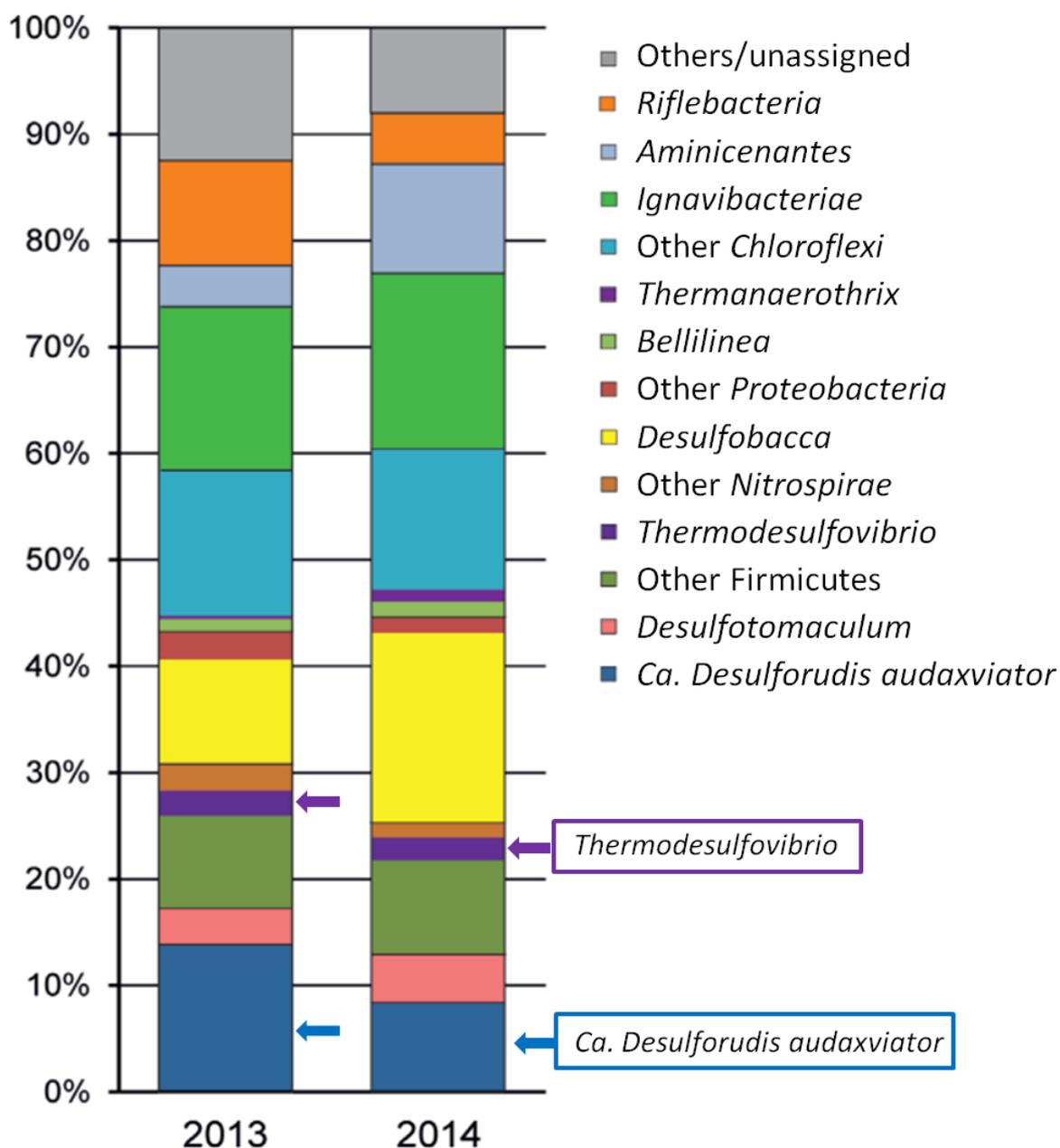


Рисунок 1. Результаты молекулярного скрининга доминирующих бактерий в пробах воды скважины 1-Р, отобранные в 2013 и 2014 гг. Род *Thermodesulfovibrio* и ‘*Candidatus Desulforudis audaxviator*’ указаны стрелками.

Накопительные культуры из воды скважин 1-Р, образующие сероводород, были получены с добавлением различных доноров электронов и углерода, включая лактат, формиат, ацетат, желатин, и сульфат в качестве акцептора электронов при 50 °С. Накопительные культуры были микроскопически неоднородными и содержали 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. После нескольких пассажей с лактатом при 70 °С в культуре стали заметно преобладать вибрионы, однако скорость роста и количество биомассы культуры снижались. Чистая культура вибрионов, обозначенная как 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*, род *Thermodesulfovibrio*. Ближайшим культивированным родственником N1 является *Thermodesulfovibrio aggregans*, сходство последовательностей гена 16S рРНК составило 97% (рис. 2). Чистоту культуры проверяли микроскопически и с помощью посева на Plate Count Agar.

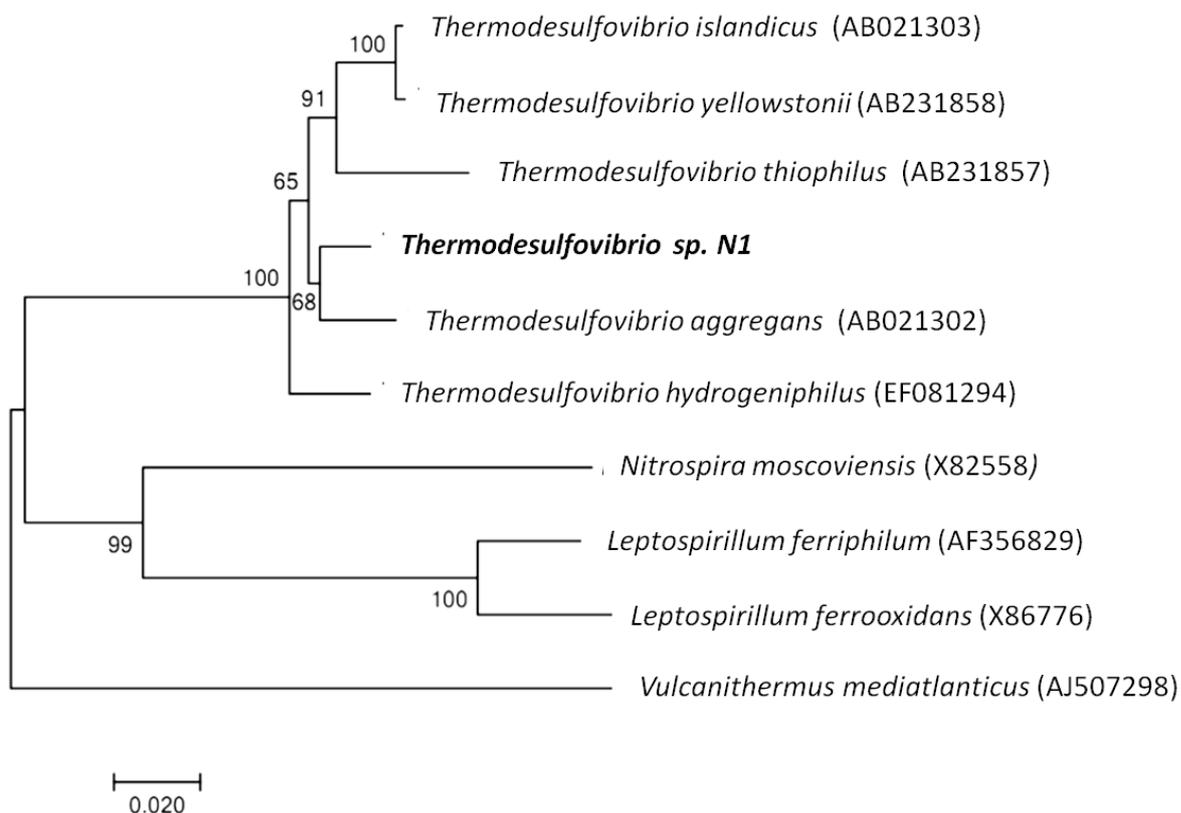


Рисунок 2. Филогенетическое положение штамма N1 на основании сравнения нуклеотидных последовательностей полноразмерного гена 16S рРНК идентифицированного в геноме штамма N1. Дерево построено методом Neighbor-joining, масштаб соответствует двум нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов.

Штамм N1 представляет подвижные вибрионы длиной 1.5-2 мкм и шириной 0.4 мкм (рис. 3). 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 (рис. 3). Температурный диапазон роста штамма N1 составил 45-74 °С, оптимум 65 °С, диапазон рН - 5.5 до 10.5, оптимальное значение рН = 8.5.

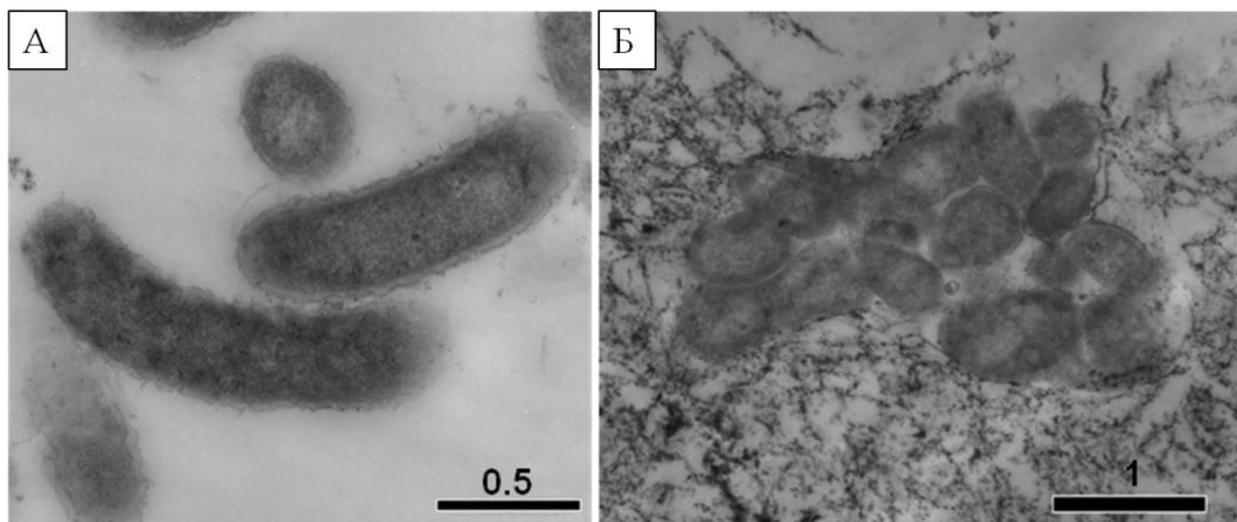


Рисунок 3. ТЭМ клеток (А) и агрегатов (Б) образованных *Thermodesulfovibrio* sp. N1. Масштаб в мкм.

*Thermodesulfovibrio* sp. N1 – строгий анаэроб. Температурный диапазон роста штамма N1 составил 45-74 °С, оптимальное значение температуры роста составляет 65 °С. Рост штамма N1 возможен в диапазоне рН от 5.5 до 10.5, оптимальное значение рН = 8.5. Для определения удельных скоростей роста при разных значениях рН проводили ростовые эксперименты в трех параллельных повторностях. Скорости роста рассчитывали по приросту численности клеток (средние значения) в каждой временной точке в ходе логарифмической фазы роста. При рН 8.5 отмечена наибольшая удельная скорость роста ( $0.078 \text{ ч}^{-1}$ ) и наименьшее время удвоения 8.88 ч (рис. 4). Для других представителей *Thermodesulfovibrio* не характерна устойчивость к

высоким значениям рН (таблица 3). Таким образом, штамм N1 является первым умеренным алкалофилом из всех известных представителей рода.

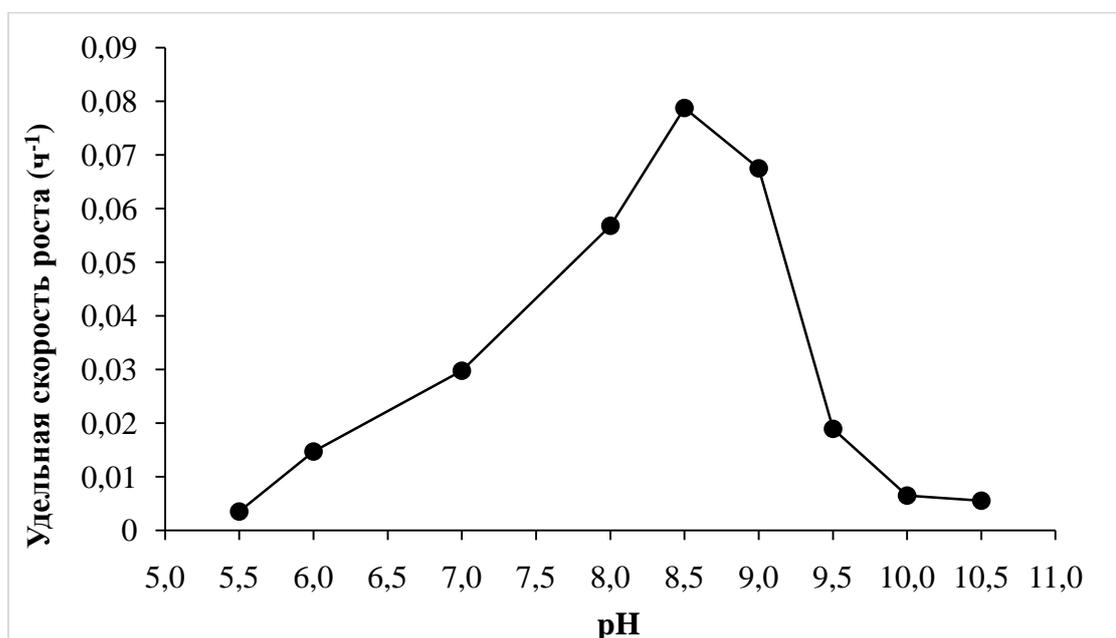


Рисунок 4. Влияние рН на удельную скорость роста штамма N1 при 65 °С на среде WB с лактатом. Представлено среднее значение из 3-х повторностей.

Анализа генома штамма N1 в ФИЦ Биотехнологии РАН, подтвердил различия между штаммом N1 и *T. aggregans*. В связи с этим основные усилия были сосредоточены на изучении особенностей физиологии этого штамма, так как он, очевидно, представляет новый вид рода и требует описания и валидации.

Результаты определения спектра доноров и акцепторов электронов для штамма, и сравнение данных с показателями для валидно описанных представителей рода представлены в таблице 3. *Thermodesulfovibrio* sp. N1 использует узкий спектр органических субстратов лактат и пируват, формиат только в присутствии ацетата, а также молекулярный водород (в присутствии ацетата в качестве источника углерода). Штамм не способен расти на простых сахарах и полисахаридах. В качестве акцепторов электронов

*Thermodesulfovibrio* sp. N1 может использовать сульфат, сульфит и тиосульфат, слабый рост отмечен на цитрате железа (Fe<sup>3+</sup>).

Таблица 3. Характеристика представителей рода *Thermodesulfovibrio*.

	N1	V2	<i>T. yellowstonii</i> (DSM 11347)	<i>T. islandicus</i> R1Ha3 (DSM 12570)	<i>T. aggregans</i> TGE-P1 (DSM 17283)	<i>T. thiophilus</i> TDV (DSM 17215)
Источник выделения	Подземный водоносный горизонт		Вода гидро-термального вента	Горячий источник	Анаэробные осадки	
Т роста, °С (оптимум)	45-74 (65)	45-74 (60)	40-70 (65)	45-70 (65)	45-70 (60)	45-60 (55)
pH (оптимум)	5.5-10.5 (8.5-9.0)	(7.2-7.5)	6.5-7.7 (6.8-7.0)	(6.8-7.0)	6.0-8.5 (6.5-7.0)	6.0-8.5 (7.0-7.5)
Доноры электронов						
Лактат	+	+	+	+	+	+
Пируват	+	+	+	+	+	+
Формиат*	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> *	+	на	+	+	+	+
Ацетат	-	-	-	-	-	-
Этанол	-	±	-	на	-	-
Акцепторы электронов						
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	+	+	+	+	+	+
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	+	+	+	+	+	+
SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	+	+	-	-	+	+
S <sup>0</sup>	-	-	-	-	-	-
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-	±	-	+	-	-
Fe (III)	+	н/а	+	+	+	+
*в присутствии ацетата 2 мМ + рост ± слабый рост - нет роста на – не анализировано						

Накопительные культуры, образующие сероводород, из воды скважины 5-Р в Томской области, были получены на основной среде WB с добавлением различных доноров электронов и углерода, включая лактат, формиат, фруктозу, и сульфат в качестве акцептора электронов. Культивирование проводили при 50 °С и 70 °С. Для дальнейшего выделения чистой культуры была отобрана

накопительная культура с лактатом при 70 °С. Накопительная культура была микроскопически неоднородной и содержала палочки и вибрионы. Чистая культуры была получена путем выделения отдельных колоний на твердой среде WB. Таким образом, на среде WB с лактатом получена еще одна чистая культура вибрионов, штамм обозначили как V2. Чистоту культуры проверяли микроскопически. Штамм V2, выделенный из воды скв. 5-Р в Колпашевском районе, оказался близкородственным *T. aggregans* (рис. 5), гомология последовательности 99%.

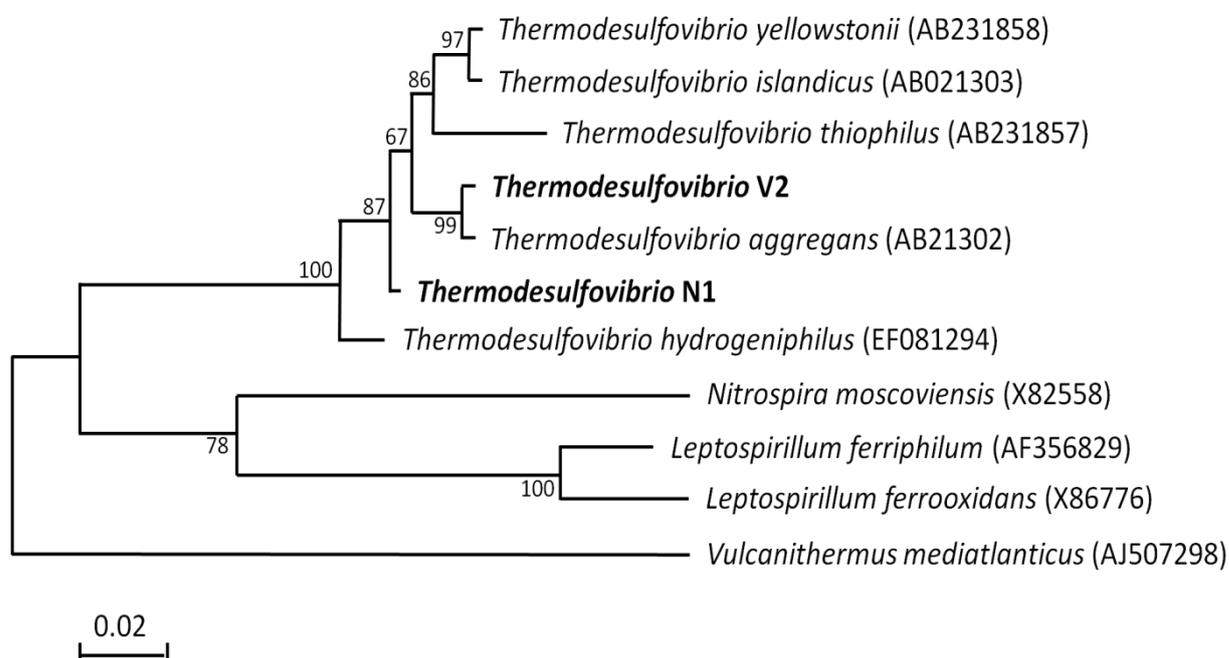


Рисунок 5. Филогенетическое положение штаммов N1 и V2 на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК методом Maximum Likelihood. Масштаб соответствует двум нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов.

Нижняя граница температуры для роста штамма *Thermodesulfovibrio* sp. V2 лежит между 45-50 °С, а верхняя выше 74 °С с оптимумом при 60 °С; оптимальный для роста штамма рН = 7.2-7.5. Результаты определения спектра доноров и акцепторов электронов для штамма, и сравнение данных с показателями для валидно описанных представителей рода представлено в таблице 3.

### 3.3. Выделение '*Desulforudis audaxviator*'

Общепринято, что разнообразные, плохо охарактеризованные микроорганизмы обитают глубоко в земной коре. Одна из таких бактерий, обитающих глубоко под землей, некультивируемый представитель филума Firmicutes, который может доминировать в молекулярных исследованиях, континентальных глубинных вод, иногда являясь единственным видом в экосистеме. Сообщество бактерии '*Candidatus Desulforudis audaxviator*' было обнаружено под поверхностью Земли в заполненных жидкостью трещинах золотоносного рудника Мпоненг в Южной Африке на глубине 2.8 километра, полностью изолированный от окружающего мира. Как и многие некультивируемые представители '*Candidatus Desulforudis audaxviator*' был обнаружен, благодаря достижениям молекулярной биологии. Обнаружили «отважного странника» давно, однако до сих пор он не был получен в культуре *in vitro*. Специфические нуклеотидные последовательности '*Candidatus Desulforudis audaxviator*' были обнаружены в нескольких, изолированных друг от друга, континентальных подземных экосистемах: (1) в Южной Африке (Labonté et al., 2015; Davidson et al., 2011; Magnabosco et al., 2014); (2) Северной Америке (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/KF939343.1>); и в Европе (Tiago et al., 2013; Kjeldsen et al., 2007). В воде скважины 1-P молекулярными методами также были обнаружены специфические нуклеотидные последовательности '*Candidatus Desulforudis audaxviator*' (рис.1).

Первичная накопительная культура получена на основной среде WB с добавлением формиата в качестве источника углерода и электронов, и сульфата в качестве акцептора электронов, а также элементного железа при 50 °C и pH=8.0. Микроскопический анализ накопительной культуры выявил разные морфотипы клеток, среди которых преобладали подвижные палочки, а также нитчатые клетки, кокки и вибрионы. Посредством пастеризации (90 °C в течение 20 мин) удалось получить культуру в которой преобладали палочки. Накопительная культура на формиате росла медленно (около 1 месяца), для

оптимизации ростовых условий при культивировании накопительной культуры были предприняты попытки смены температуры и имитации твердых пород (стеклянные бусины, керамический бисер), однако существенного результата это не принесло. Полученный однородный изолят тонких спорообразующих палочек обозначили как ВУФ. Смесь формиата и ацетата натрия позволили ускорить рост штамма ВУФ и сократить лаг-фазу с одного месяца до 10 дней. Анализ последовательности гена 16S рРНК показал, что штамм ВУФ на 100% идентичен ранее некультивируемому '*Candidatus Desulforudis audaxviator*'. '*Desulforudis audaxviator*' ВУФ - длинные, тонкие спорообразующие палочки (рис. 6). Оптимальная температура роста штамма составляла 55 °С, нижняя граница роста – 45 °С, верхняя граница роста – 60 °С (рис. 7).

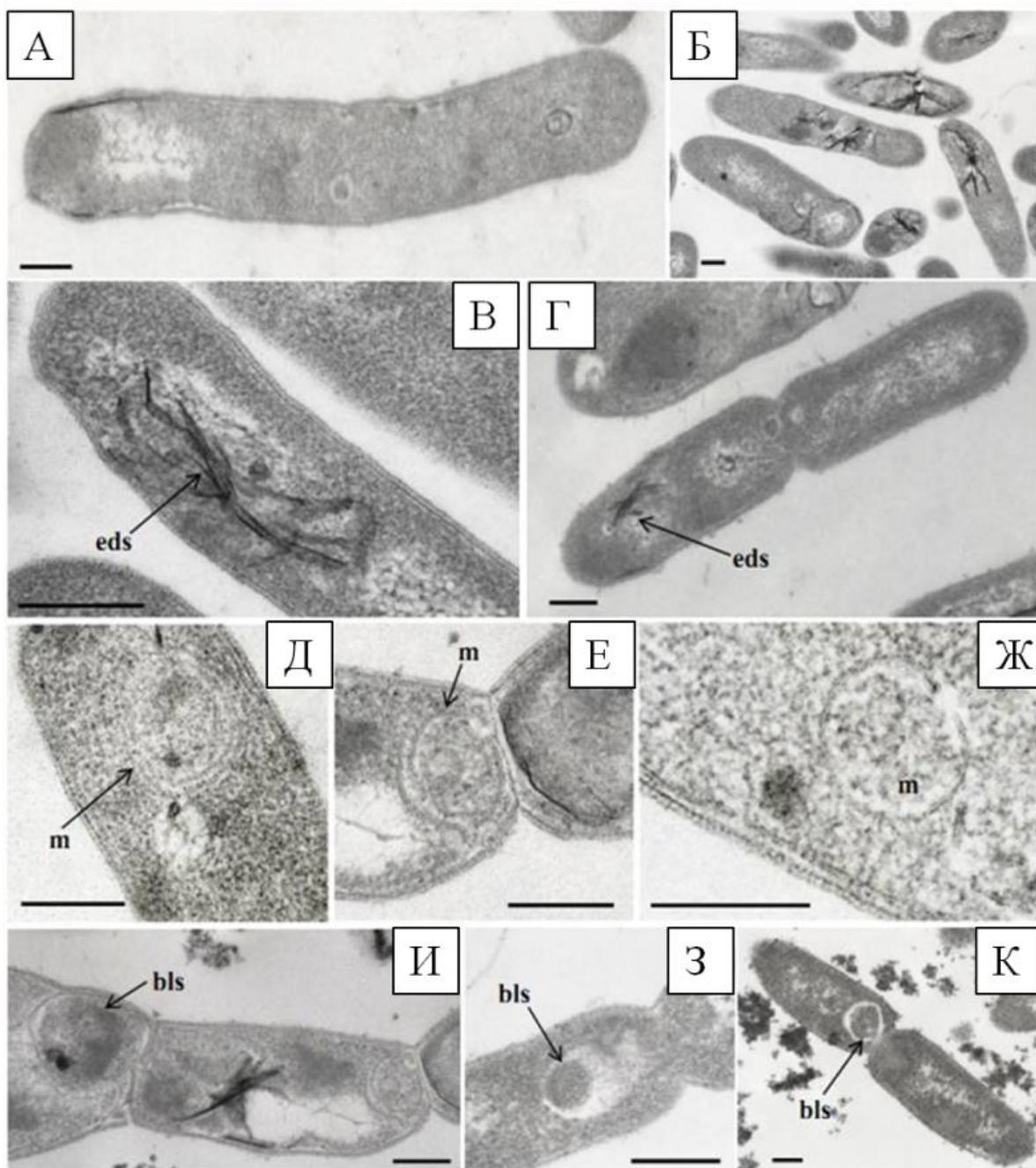


Рисунок 6. ТЭМ микрофотографии штамма ВУФ: (А) медленно растущие клетки с лаг-фазой месяц, масштабная линейка 5 мкм; (Б-В) быстрорастущие клетки и электронно-плотные структуры; (В-Г) клеточная стенка и электронно-плотная структура; (Д-Ж) мезосомоподобные структуры; (З-К) «почковидные» структуры. Масштабные линейки 0.2 мкм.

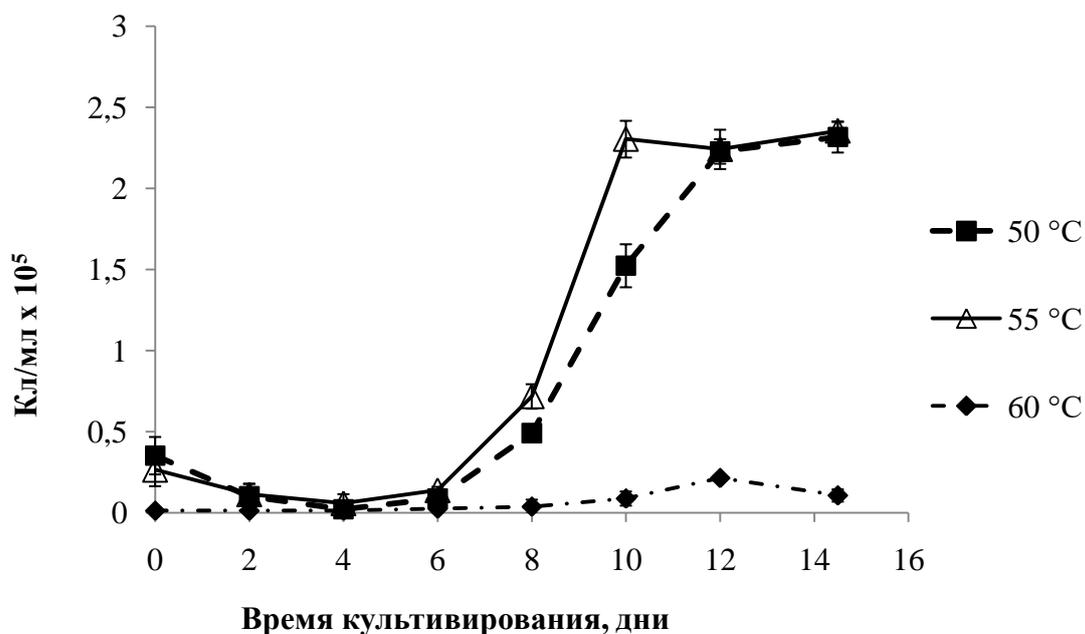


Рисунок 7. Рост штамма BYF при различных значениях температуры на среде WB с формиатом и ацетатом.

Максимальная концентрация NaCl в среде для роста штамма BYF составляла 1.0%, а оптимальное значение составляет 0.1%. Оптимальное значение pH для роста штамма *Desulforudis audaxviator* sp. BYF pH=8.0, нижняя граница роста pH=7.0, верхняя pH=9.5 (рис. 8).

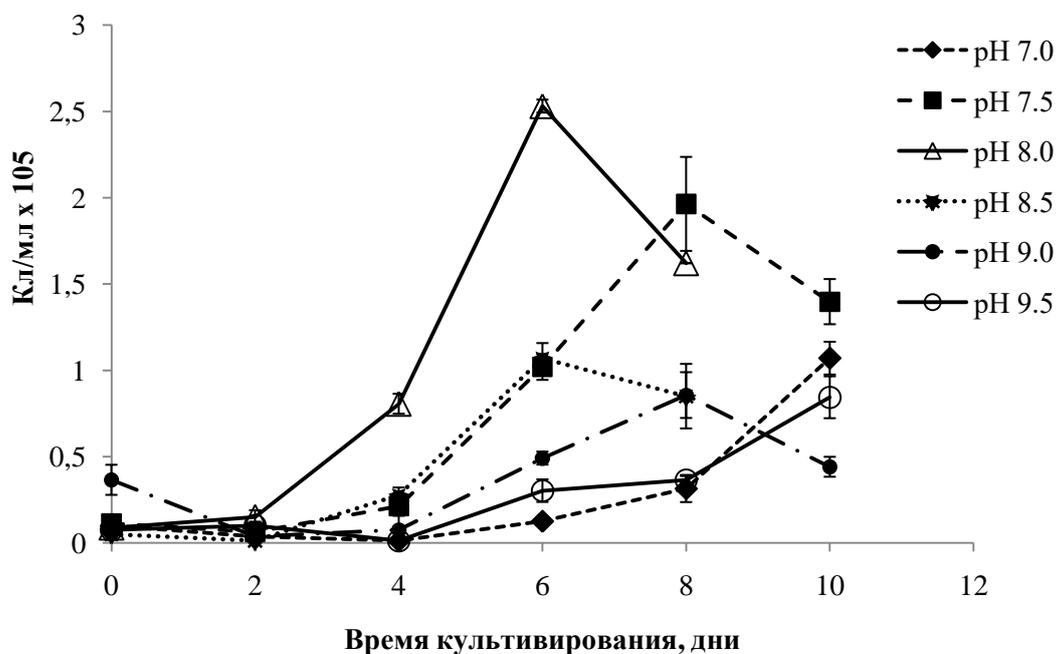


Рисунок 8. Рост штамма BYF при различных значениях pH на среде WB с формиатом и ацетатом.

Помимо формиата '*Desulforudis audaxviator*' мог использовать: H<sub>2</sub>, лактат, фумарат, пируват, сукцинат, пропионат, этанол, изобутанол, глюкозу, сахарозу, холин (таблица 4).

Таблица 4 – Доноры и акцепторы электронов для штамма ВУФ

Доноры электронов		Акцепторы электронов	
Использует	Не использует	Использует	Не использует
Формиат	Ацетат	Сульфат	Сера элементная
Форитат+ацетат	Малат	Сульфит	Нитрит
Лактат	Бензоат	Тиосульфат	
Фумарат	Пептон	Нитрат	
Пируват	Желатин	Арсенат	
Сукцинат	Цистеин	Fe-NTA	
Пропионат	Глицерол	Фумарат	
Бутират	Пропанол	(слабый рост)	
Пальмитат	Фруктоза		
Этанол	Микрокристаллическая		
Изобутанол	целлюлоза		
Сахароза	Нефть		
Глюкоза			
Холин			
Аланин (слабый рост)			
H <sub>2</sub>			
H <sub>2</sub> +формиат			
H <sub>2</sub> +ацетат			
H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub>			

Отличительной морфологической особенностью штамма ВУФ были газовые вакуоли, которые встречались только в спорулирующих клетках (рис. 9). Известно, что заполненные газом белковые газовые вакуоли обеспечивают клеткам плавучесть (Pfeifer, 2012). Таким образом, споры '*Candidatus Desulforudis audaxviator*', связанные с газовыми вакуолями, могут представлять

собой механизм, который позволяет штамму распространяться на большие расстояния.

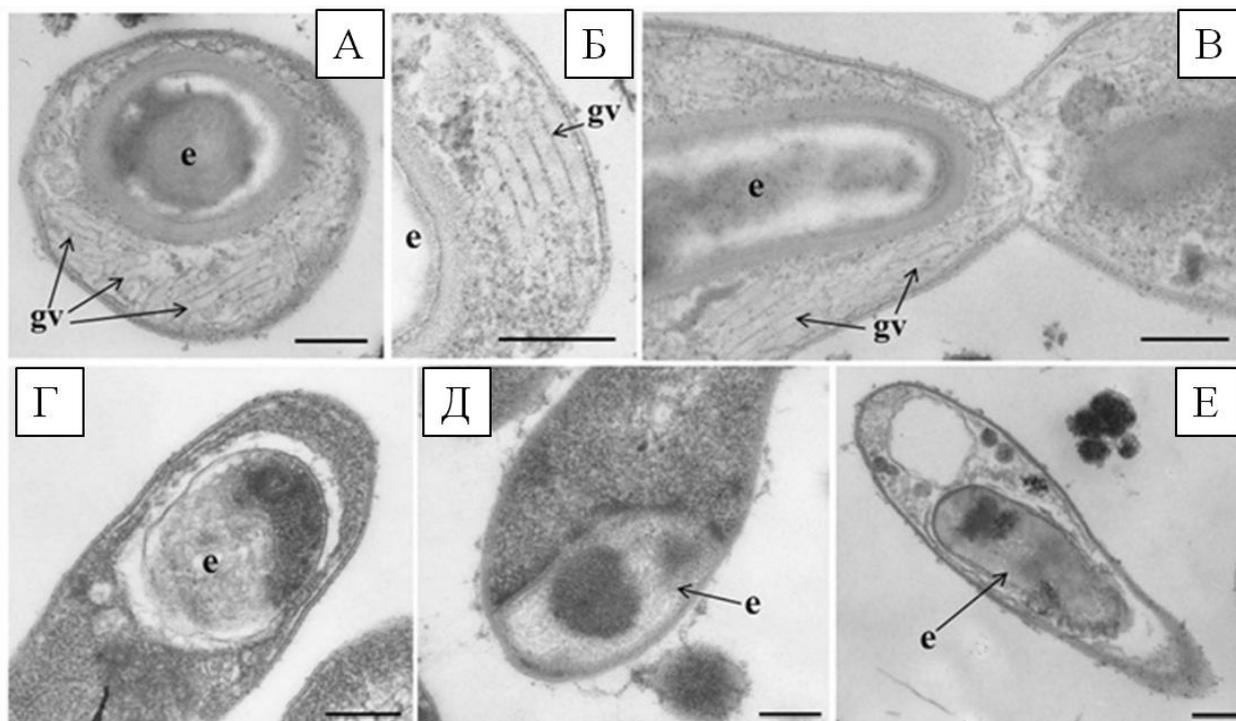


Рисунок 9. ТЭМ микрофотографии штамма ВУФ: (А-В, gv) газовые вакуоли, связанные со спорами (Г-Е, e). Масштабные линейки 0.2 мкм.

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. Скорость роста штамма ВУФ в лабораторной культуре была значительно выше предполагаемых ранее значений и составляла  $0.027 \text{ час}^{-1}$ . Однако медленный рост при невысокой численности клеток препятствовал депонированию организма в международные коллекции и приданию валидного статуса роду и виду. Электронная микроскопия выявила в клетках бактерии электронно-плотные структуры, напоминающие ацидокальцисомы (рис. 6, 10).

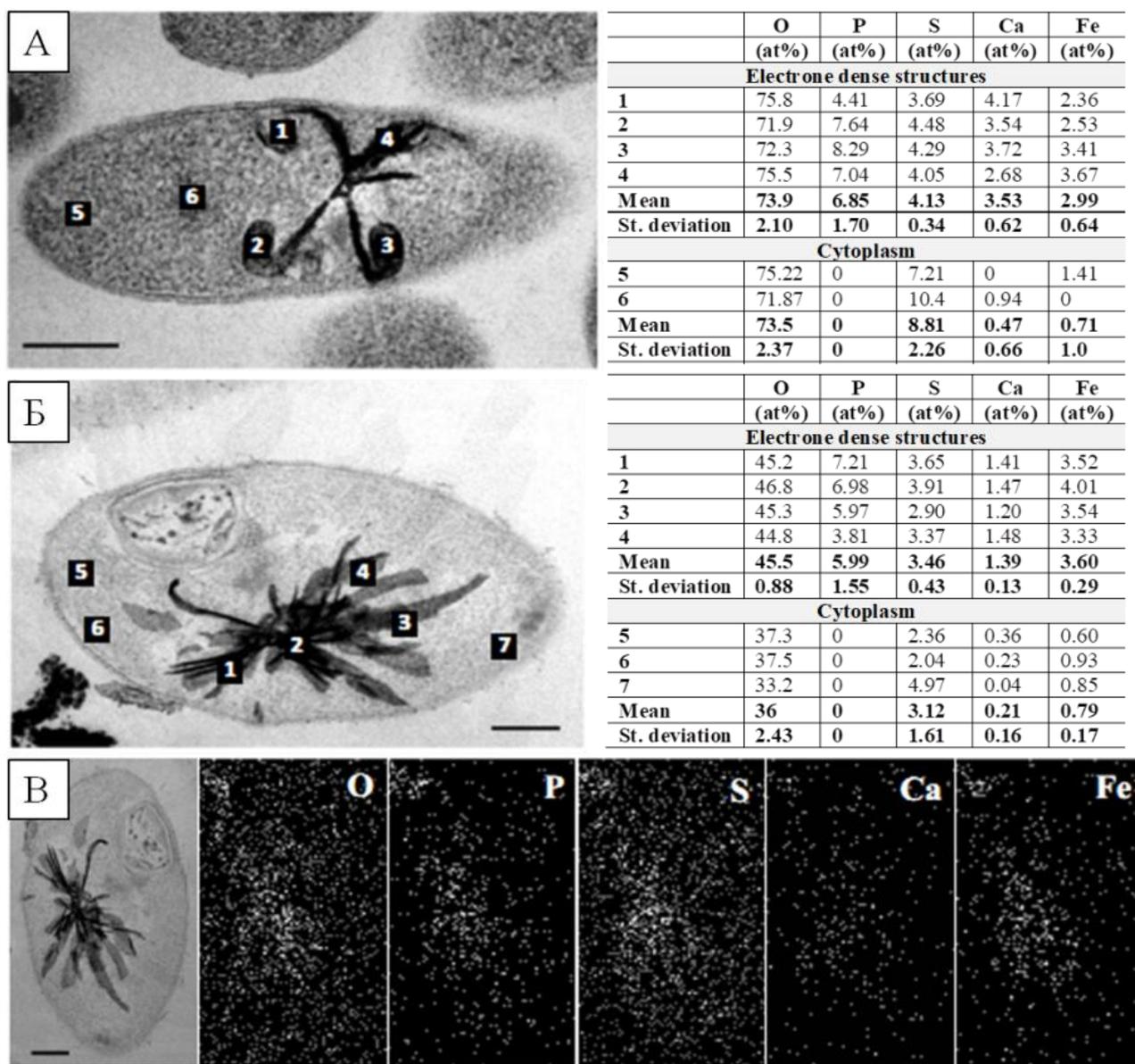


Рисунок 10. Микрофотографии ТЭМ с энергодисперсионной спектроскопией (TEM-EDS) и соответствующие атомные проценты O, P, S, Ca и Fe, измеренные в электронно-плотных структурах и цитоплазме штамма BYF. Клетки на среде с формиатом и ацетатом растущие в течение (А) 19, (Б) 34 и (В) 14 дней. Масштабная линейка 0.2 мкм.

Дополнительные исследования элементного состава образований по схеме, описанной ранее, подтвердили, что электронно-плотные структуры обогащены кальцием и фосфором (рис. 10). Ca и P накапливались непосредственно в области предполагаемой ацидокальцисомы, в то время как распределение S и Fe в клетке было случайным. Мы предположили, что при

выращивании бактерии на используемой ранее модифицированной среде Видделя-Бака, избыток фосфора и кальция депонируется в ацидокальцисомах, что может приводить к дополнительным энергетическим затратам и снижению скорости роста.

Глубинные воды, в которых обитает '*Desulforudis audaxviator*', характеризуются повышенной ионной силой по сравнению с пресноводными экосистемами из-за смешения древней морской воды с пресноводными осадками, питающими подземные горизонты. Несмотря на тот факт, что общая минерализация глубинной воды, вскрываемой скважиной в поселке Белый Яр, составляет 1.8 г/л, эти биотопы дефицитны по кальцию и магнию. Содержание Са менее 10 мг/л и следовые количества фосфора были зафиксированы в воде. В силу специфики местообитания, простое разбавление основной среды, используемое исследователями при культивировании олиготрофов, не подходит для выращивания организмов из глубинных подземных горизонтов (рис. 11).

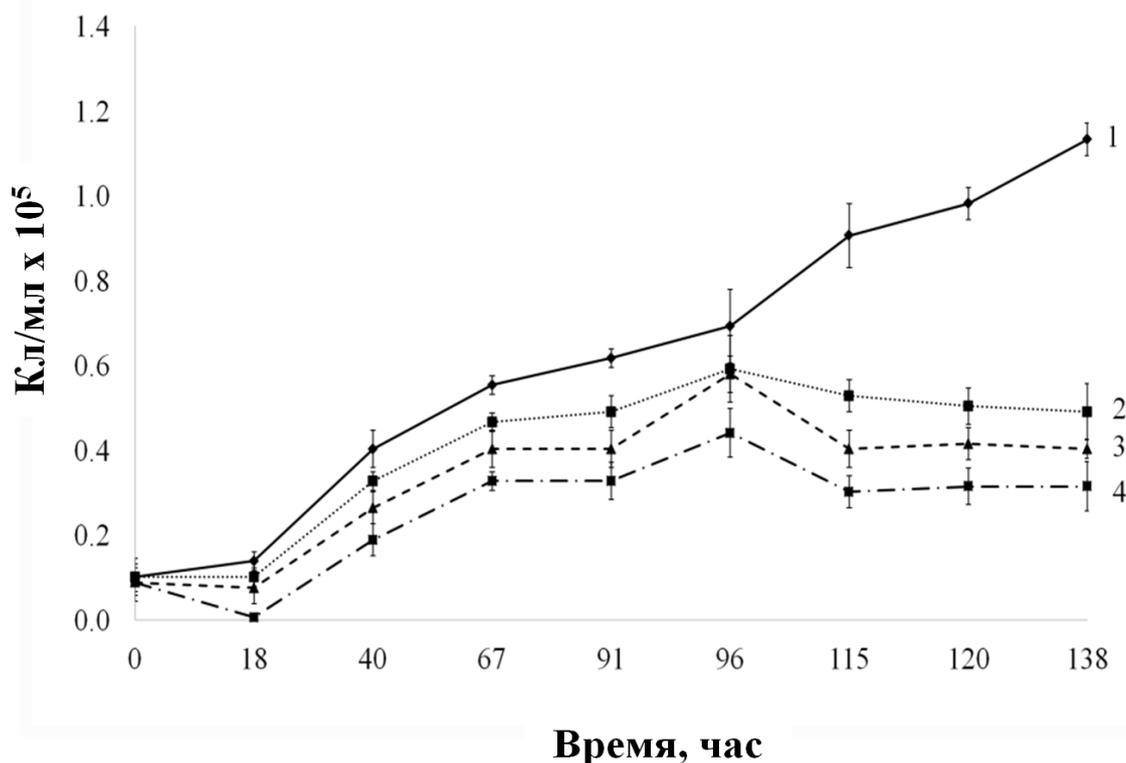


Рисунок 11. Влияние разбавления среды на рост штамма BYF. Обозначения: (1) основная среда WB; (2) разбавление в 2 раза; (3) разбавление в 5 раз; (4) разбавление в 10 раз.

Для проверки гипотезы об ингибирующем действии высоких концентраций кальция и фосфора были поставлены эксперименты по определению кинетических параметров роста штамма BYF на среде со сниженным содержанием этих элементов. В экспериментах была использована пресноводная среда Видделя-Бака (Widdel, Bak, 1992). Формиат (7.5 мМ) и ацетат (2.5 мМ) использовали в качестве донора электронов и источника углерода. Ранее мы модифицировали среду Видделя-Бака для культивирования штамма BYF, внося удвоенное количество (48 г/л) восстановителя,  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , и элементное железо, присутствие которого является необходимым для роста бактерии. В опытных вариантах снижали концентрацию солей кальция и фосфата. В первом варианте опыта концентрация  $\text{CaCl}_2$  в модифицированной среде Видделя-Бака была снижена с 0.113 до 0.025 г/л без изменения других компонентов среды. Во втором варианте - концентрация  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  была снижена

с 0.2 до 0.05 г/л основной среды. В контрольном варианте состав среды не изменяли. Для снижения концентрации фосфата и кальция в инокуляте для опытных вариантов проводили предварительные пересевы культуры на модифицированную среду с низкой концентрацией, так как культура не выдерживает отмывки путем центрифугирования. За ростом следили по количеству клеток в культуре, которое учитывали в трех повторностях.

Культивирование штамма ВУФ в двух опытных вариантах на модифицированных средах приводило к увеличению количества клеток в культуре по сравнению с контролем (рис. 12). 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 возросла до 0.046 (время удвоения 15.1 час) против  $0.026 \text{ час}^{-1}$  (время удвоения 26.7 час) в контроле только на среде с пониженным содержанием кальция. Оба экспериментальных варианта характеризовал ранний лизис клеток в конце стационарной фазы.

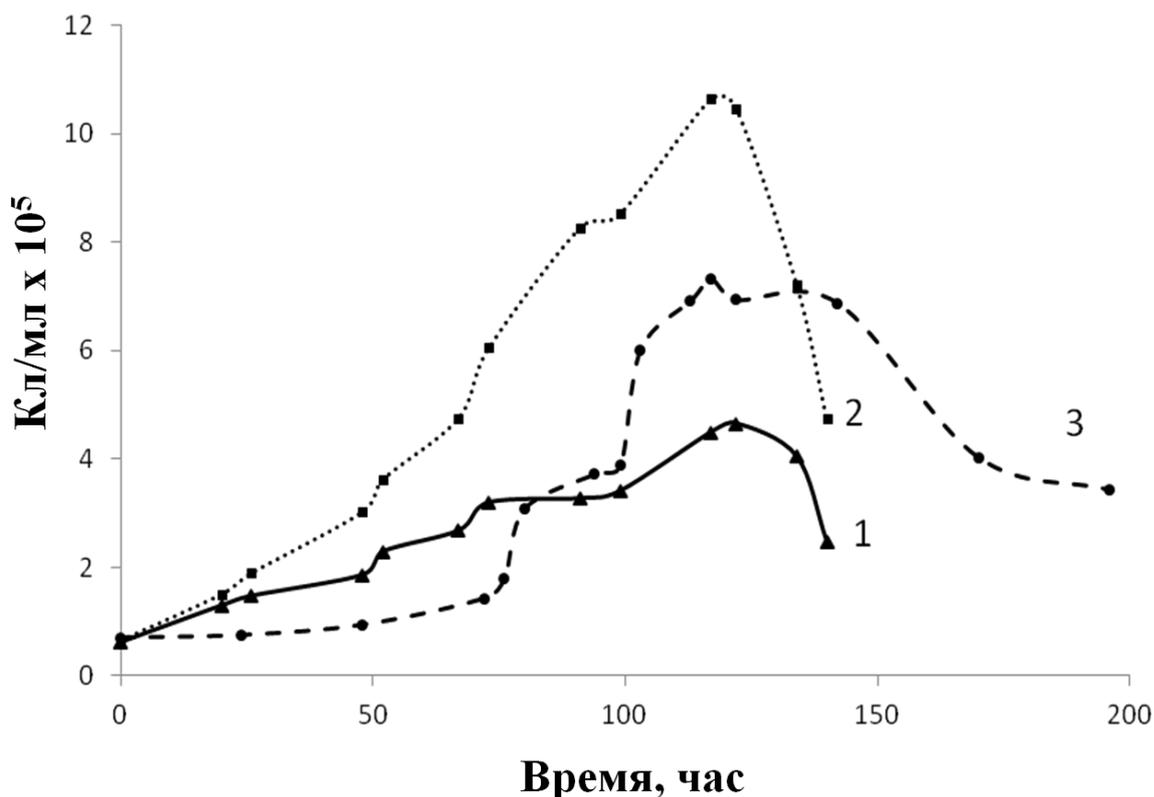


Рисунок 12. Рост *Desulforudis audaxviator* штамм ВУФ на модифицированной среде Видделя с формиатом: (1) контроль; (2) среда со сниженной концентрацией  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; (3) среда со сниженной концентрацией  $\text{CaCl}_2$ .

Геномная информация о метаболизме сложно-культивируемой бактерии также может помочь в оптимизировании условий культивирования. Мы обратили внимание на присутствие белков, участвующих в синтезе полиаминов в геноме *Desulforudis audaxviator*. Спермидин синтаза и агманитаза, необходимая для синтеза предшественника спермидина, находятся в одном опероне, что предполагает существование действующего пути синтеза спермидина у бактерии. Хотя существует доказанная связь синтеза полиаминов с термофилией прокариот, роль спермидина в метаболизме бактерий до сих пор остается малоизученной (Michael, 2018). Существуют предположения о возможности связывания полиаминов с пептидогликаном клеточной стенки, что повышает ее ригидность (Hirao et al., 2000; Namana et al., 2012). Наиболее вероятной гипотезой мы считаем участие спермидина в защите от

окислительного стресса. Ранее участие полиаминов, спермидина и путресцина, в защите от токсичного действия  $O_2$ , супероксида и перекиси водорода было продемонстрировано на мутантах *E. coli* с нарушенным синтезом полиаминов (Chattopadhyay et al., 2003). В наших экспериментах мы дополнительно вносили спермидин (1.45 мг/л, BioChemica PanReas AppliChem) в модифицированную среду Видделя-Бака. В среде с добавлением спермидина наблюдали максимальную удельную скорость роста штамма BYF -  $0.086 \text{ ч}^{-1}$  (время удвоения 8.05 ч), 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 Видделя-Бака и дополнительное внесение спермидина позволяет выращивать '*Desulforudis audaxviator*' штамм BYF в лабораторных условиях со скоростями сопоставимыми для традиционных анаэробов.

### **3.4 Образование сульфидов железа микроорганизмами подземной биосферы**

Несмотря на обширные литературные данные о численности биомассы, филогенетическом разнообразии и активности прокариот подземной биосферы, глобальной геохимической ролью микроорганизмов глубинных экосистем заинтересовались относительно недавно (Yamamoto et al., 2019). Геохимическую роль сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) в глубоких подземных водоносных горизонтах еще предстоит выяснить. Неясно, в какой степени СРБ могут участвовать в осаждении железа в подземных водоносных горизонтах, что, как известно, является основным биогеохимическим последствием микробного восстановления сульфатов в морской среде. В литературе отсутствуют сведения о способности образовывать биогенные осадки сульфидов СРБ подземных экосистем.

Сульфиды железа могут быть использованы в качестве адсорбента для удаления других токсичных металлов биогенные сульфиды эффективнее, чем другие адсорбенты (например – активированный уголь или гидроксиды), они образуют меньше шлама и проявляют низкую растворимость. Пирит – один из самых распространенных в земной коре сульфидов. Залежи пирита сосредоточены в месторождения гидротермального происхождения и метаморфических породах.

Единственным кристаллическим сульфидом, обнаруженным в осадках, был грейгит ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ), продуцируемый всеми штаммами. Пирита и других кристаллических сульфидов железа не обнаружено (рис. 13, 14). В осадках штамма ВУФ, растущего при содержании  $\text{Fe}^{2+}$  100 мг/л и  $\text{Fe}^{2+}$  1 г/л и  $\text{pH}=8.0$ , кристаллические сульфиды не образовывались (рис. 15). Напротив, штамм N1 образовывал грейгит при  $\text{Fe}^{2+}$  100 мг /л, а более высокие значения  $\text{pH}=8.5$  способствовали его образованию по сравнению с  $\text{pH}=5.5$  (рис. 16). Кристаллические минералы железа, характерные для железоредуцирующего роста, сидерит ( $\text{FeCO}_3$ ), гетит ( $\text{Fe}^{3+}\text{O}(\text{OH})$ ), лепидокрокит ( $\text{FeO}(\text{OH})$ ), обнаружены в осадках, продуцируемых штаммом ВУФ. В абиотических контролях во всех опытах не наблюдалось кристаллических сульфидов.

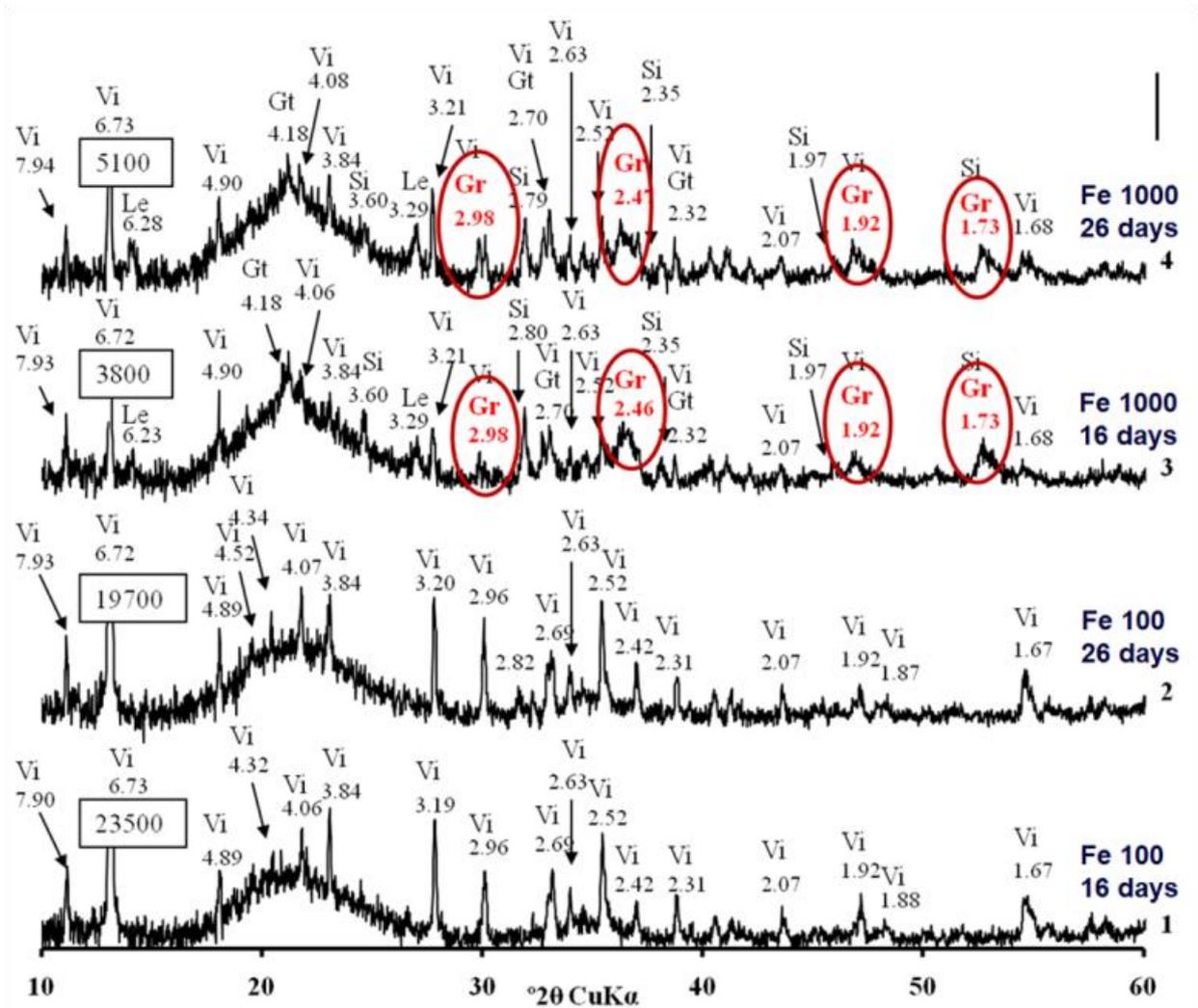


Рисунок 13. XRD осадка, образованного штаммом *Desulforudis audaxviator* ВУФ после 16 и 26 суток культивирования с  $\text{Fe}^{2+}$  100 мг/л (1, 2) и 1 г/л (3, 4) при pH 6.5, 55 °С.

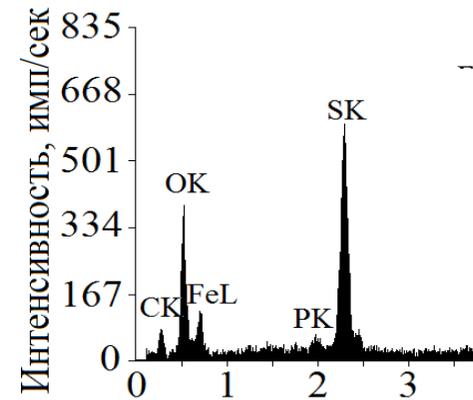
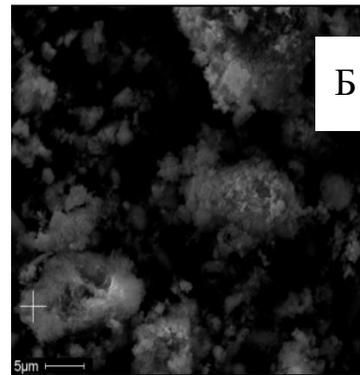
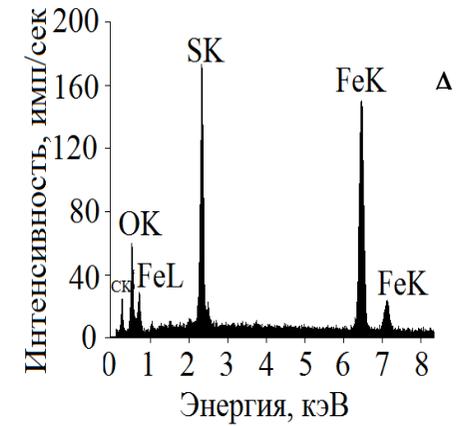
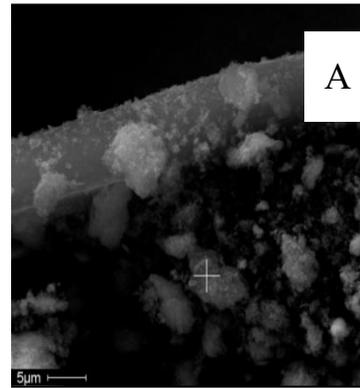
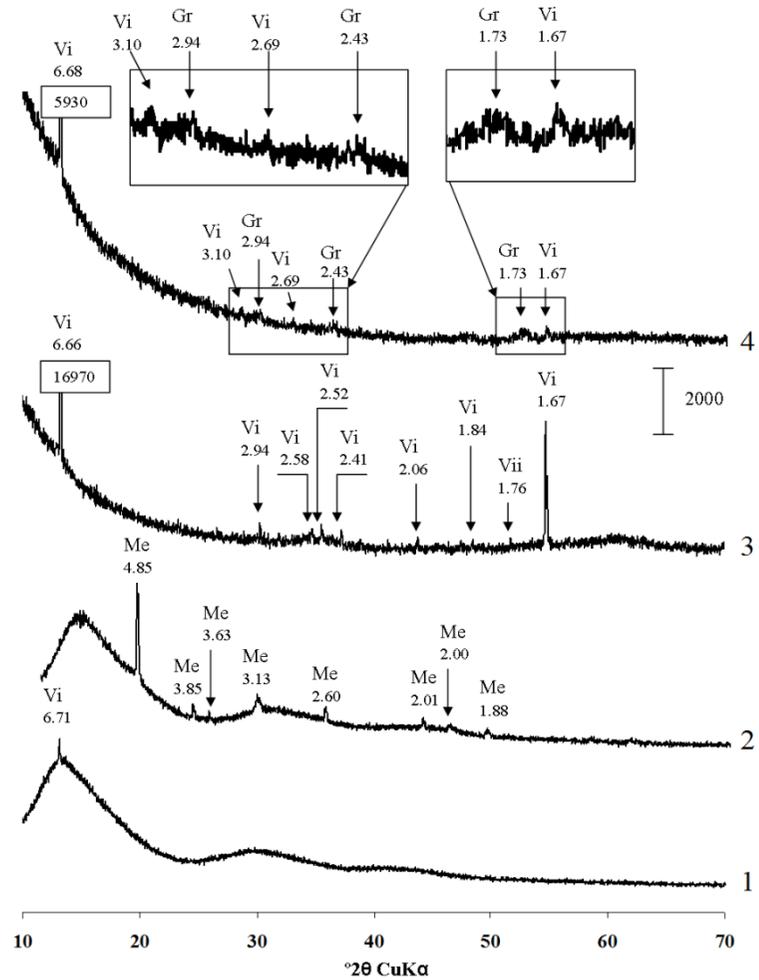


Рисунок 14. XRD и СЭМ-ЭДС (А-Б) спектры осадка, полученного при культивировании *Thermodesulfovibrio* sp. V2 через 16 (1-2, А) и 26 (3-4, Б) дней культивирования с  $\text{Fe}^{2+}$  100 мг/л при рН 7.5, 65 °С. Абиотический контроль (1, 3) и опыт (2, 4).

Хотя железо не рассматривается как токсичный металл, наши данные свидетельствуют о том, что устойчивость СРП к  $Fe^{2+}$  может различаться. '*Desulforudis audaxviator*' штамм ВУФ оказался чувствительным к концентрации железа и не рос при содержании более 1.7 г/л. Внесение  $Fe^{2+}$  в среду в концентрации 150 мг/л ингибировало рост по сравнению с условиями без дополнительного внесения железа. Для штамма *Thermodesulfovibrio* sp. N1, также выделенного из воды скв. 1-Р, ранее определена сопоставимая предельная концентрация железа, около 2 г/л (таблица 5).

Полученные данные об образовании грейгита под действием чистых культур *Thermodesulfovibrio* sp. N1 и V2, '*Desulforudis audaxviator*' представляют интерес (рис. 12-15), т.к. к настоящему моменту считалось, что все СРП образуют кристаллические сульфиды железа в виде пирита в геохимически значимых масштабах.

Таблица 5. Предельные концентрации  $Fe^{2+}$  для роста штаммов *Thermodesulfovibrio* sp. N1 и sp. V2, '*Desulforudis audaxviator*' sp. ВУФ

	Предельная концентрация $Fe^{2+}$ , мг/л
<b>N1</b>	2050
<b>V2</b>	1600
<b>ВУФ</b>	1700

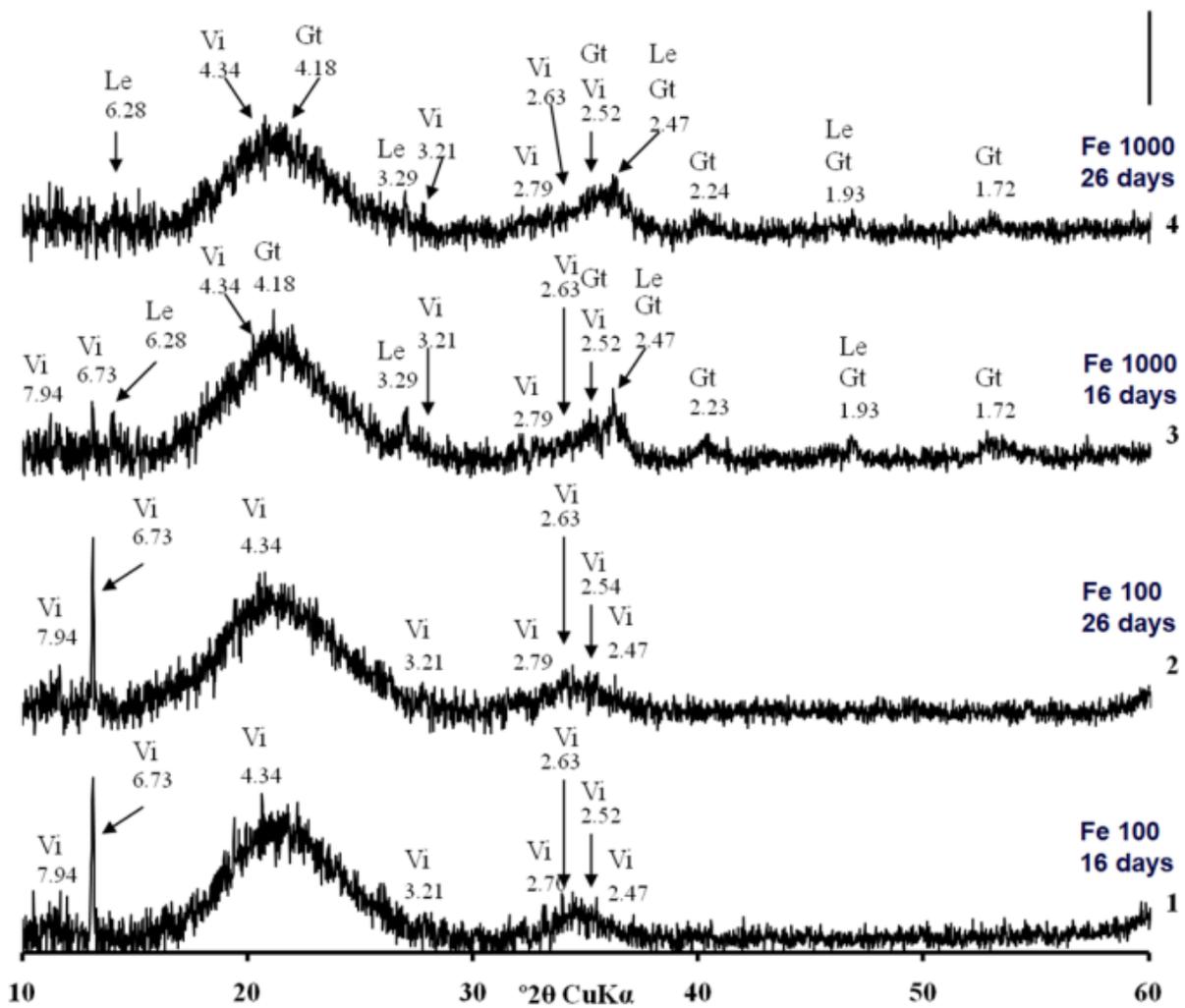


Рисунок 15. XRD осадка, образованного штаммом *Desulforudis audaxviator* ВУФ после 16 и 26 суток культивирования с  $\text{Fe}^{2+}$  100 мг/л (1, 2) и 1 г/л (3, 4) при рН 8.0, 55 °С.

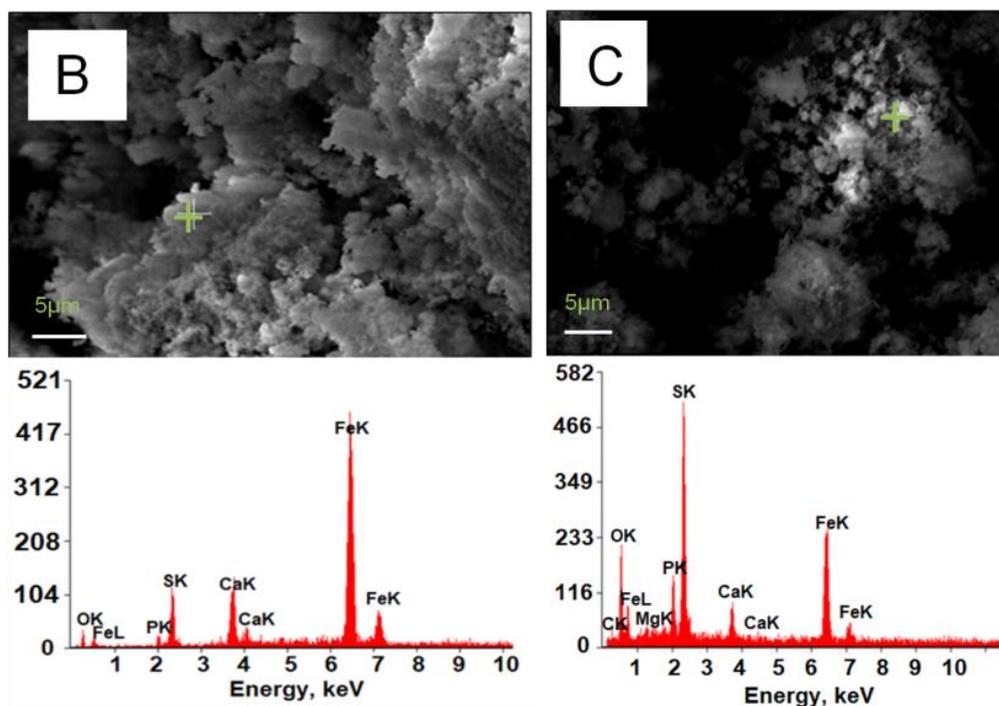
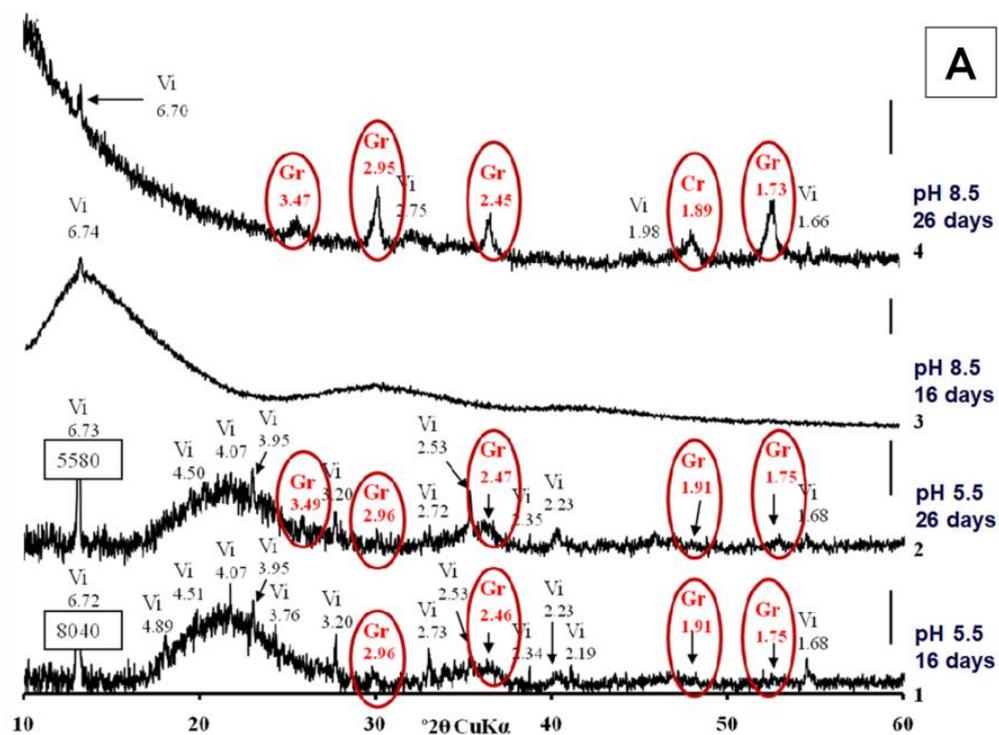


Рисунок 16. XRD (A) и СЭМ-ЭДС (B-C) спектры осадка, полученного при культивировании *Thermodesulfovibrio* sp. N1 через 16 (B) и 26 (C) дней культивирования с  $Fe^{2+}$  100 мг/л при pH 6.5 (1, 2) и pH 8.5 (3, 4), 65 °С.

### 3.5 Использование микробных обрастаний для получения культур микроорганизмов подземной биосферы

К настоящему времени стало очевидно, что подземные термальные системы являются типичным местообитанием спорообразующих сульфатредуцирующих бактерий. Значительное количество представителей семейства “*Desulfotomaculaceae*” было выделено из глубинных горизонтов. *Desulfotomaculum salinum* выделен из нефтегазоносных пластов в Западной Сибири (Назина и соавт., 2005), *Desulfotomaculum kuznetsovii* (Назина и соавт., 1988) и *Desulfotomaculum thermocisternum* (Nilsen et al., 1996) – из высокотемпературных нефтяных месторождений, *Desulfotomaculum geothermicum* (Daumas et al., 1988) и *Desulfotomaculum australicum* (Love et al., 1993) – из глубинных водоносных пластов, *Desulfotomaculum luciae* из горячего источника и *Desulfotomaculum putei* из осадков Триаса (Liu et al., 1997). В 2006 году был описан новый вид *Desulfotomaculum thermosubterraneum* (Kaksonen et al., 2006), культура которого была получена из черных обрастаний на стенах глубокой шахты в геотермально активном районе Японии. В 2008 г. из горячего источника в Тунисе выделен и описан *Desulfotomaculum hydrothermale* (Haouari et al., 2008). И еще два новых вида, *Desulfotomaculum aquiferis* и *Desulfotomaculum profundum*, были выделены из водоносного горизонта, ассоциированного с глубинным месторождением природного газа (Berlendis et al., 2016).

#### 3.5.1 *Desulfallas* sp. Bu 1-1 и *Desulfotomaculum* sp. BuA

Накопительные культуры СРП микробных обрастаний скважины Г-1 (рис. 17) были получены с использованием пресноводной среды Видделя-Бака с сульфатом, при различных значениях рН (рН=3, рН=7, рН=9) и различных донорах углерода и электронов: ацетат, глицерин, глюкоза, изобутират, лактат, малат, пируват, пропионат, сахароза, сукцинат, формиат, фумарат, этанол.

Чистые культуры СРБ из микробных обрастаний скважины Г-1 получали из отдельной колонии, выросшей на твердой питательной среде. Также 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). Предварительно было отобрано несколько перспективных накопительных культур, полученных из микробных матов, развивающихся на изливе скважины Г-1, активно продуцирующих сероводород. Были выбраны 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. Выделение чистых культур проводили путем последовательных десятикратных разведений. Исследование накопительных культур под микроскопом показало присутствие клеток со спорами. Для их выделения культуры выдерживали при температуре 95 °С в течение 15 мин. После чего получали отдельные колонии на твердой среде с добавлением изобутирата и ацетата в качестве источников углерода и электронов. Изолят, выделенный на среде с изобутиратом, был обозначен как штамм Bu 1-1 (рис. 17), а на среде с ацетатом – BuA. Филогенетический анализ показал, что представители рода *Desulfallas* являются ближайшими родственниками штамма Bu 1-1, однако все они значительно удалены, сходство последовательности гена 16S рНК составило 95%. При этом, сходство последовательностей гена 16S рНК, 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 arcticus*, 91.27% – с *Desulfallas thermosapovorans*. Штамм Bu 1-1, вероятно, является представителем нового рода, так как сходство последовательности гена 16S рНК значительно ниже порога 98.7%, определяемого для различных видов (Chun et al., 2018). Ближайшим родственником штамма BuA является *Desulfotomaculum putei* со сходством последовательностей 99.85%. Вероятно, штамм BuA является новым штаммом *D. putei*. В 2020 г. род *Desulfotomaculum*

реклассифицировали и *Desulfotomaculum putei* был переименован *Desulforamulus putei*.

Интересно отметить, что последовательность гена 16S рРНК штамма Bu 1-1 полностью совпадала с депонированной в GenBank NCBI KC439348, принадлежащей неопубликованному *Desulfotomaculum* sp. MP104 PS13. Номер штамма предполагает, что бактерия была выделена из той же шахты Мпоненг в Южной Африке, в которой был найден далекий родственник группы *Desulfotomaculum*, '*Candidatus Desulforudis audaxviator*' (Chivian et al., 2008), выделенный в нашей лаборатории из воды глубинной скважины в Томской области. Мы предполагаем, что полученные нами из микробных обрастаний чистые культуры *Desulfallas* sp. Bu 1-1 и *Desulfotomaculum* sp. BuA происходят из подземных вод, вскрываемых скважиной Г-1 в Тункинской долине. Физиология штамма Bu 1-1 описана в таблице 6.

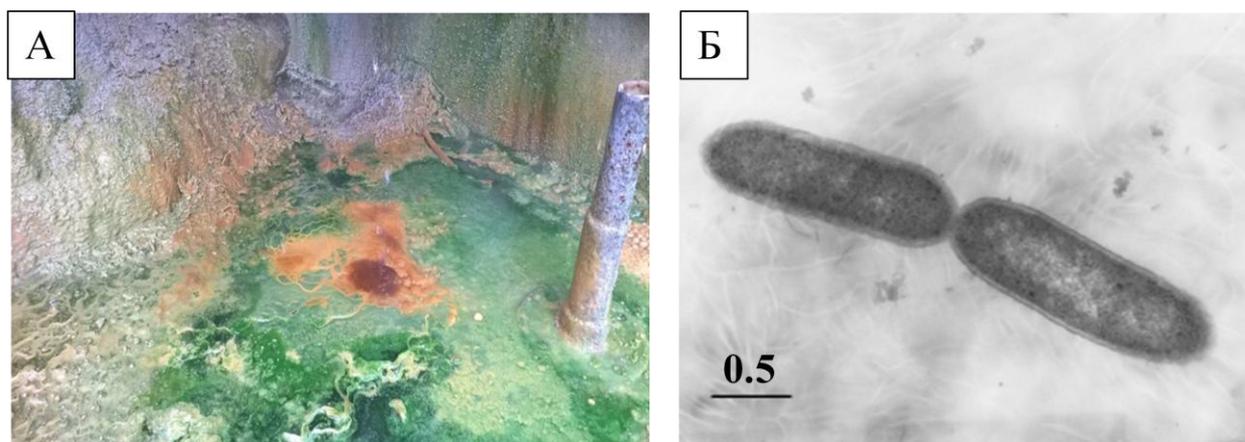


Рисунок 17. Микробные обрастания на устье скважины Г-1 (А) и ТЭМ клеток штамма Bu 1-1 (Б). Масштабная линейка 0.5 мкм.

Таблица 6. Характеристика штамма Bu 1-1 и *D. geothermicum*

<b>Характеристика</b>	<b>Bu 1-1</b>	<b><i>D. geothermicum</i></b> (Daumas et al., 1988)
Морфология	палочки	палочки
Размер клеток (μм)	0.5·1.4-2.8	0.5·2.3-2.5
Подвижность	+	+
Споры	центральна - субтерминальная	субтерминальная
Оптимальная температура (°C)	50-55	54
Границы температуры (°C)	37-60	34-56
Оптимум pH (границы)	7.0-7.2 (6.8-9.0)	7.2-7.4 (6.0-8.0)
Граница NaCl (%)		0.2-5.0
Оптимум NaCl (%)		2.4-3.4
<b>Доноры электрона и углерода</b>		
Ацетат	+	-
Бутират	+	+
Этанол	+	+
Формиат	+	+
Фруктоза	+	+
Глюкоза	слабый рост	нд
Глицерол	-	нд
Изобутират	+	нд
Лактат	+	+
Малат	+	нд
Пропионат	+	+
Пируват	+	нд
Сукцинат	+	нд
Желатин	+	нд
Пальмитат	+	нд
Пептон	+	нд
<b>Акцепторы электрона</b>		
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	+	+
SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	+	+
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	+	нд
S <sup>0</sup>	-	-
NO <sup>3-</sup>	-	-
Фумарат	слабый рост	-

### 3.5.2 *Thermoanaerosceptrum* sp. BuN1

В 2019 г. из подземных горизонтов Большого Артезианского Бассейна в США была выделена и описана бактерия, *Thermoanaerosceptrum fracticalcis*, представляющая новый род, филогенетически удаленный от таксономически описанных представителей *Firmicutes* (Hamilton-Brehm et al., 2019). Организм представляет минорный компонент микробного сообщества и использует узкий круг органических субстратов для гетеротрофного роста. Возможная роль бактерии в сообществе остается непонятной, так как единственным субстратом, который позволял рутинное культивирование, является фумарат, чье присутствие в подземных водах не очевидно. Авторы предполагают, что *T. fracticalcis* может использовать криптические продукты метаболизма других организмов, что и объясняет его незначительное содержание в сообществе. В геноме *T. fracticalcis* обнаружена бисульфитредуктаза, *dsrAB*, предполагающая способность к сульфатному дыханию. Однако авторы не смогли экспериментально подтвердить использование сульфата, равно как и других соединений серы с промежуточной степенью окисления, в качестве акцепторов электронов.

Активные накопительные культуры спорообразующих сульфидогенов были получены нами из микробных обрастаний скважины Р-1, республика Бурятия, на среде WB с глюкозой. Для их выделения в чистую культуру проводили пастеризацию накопительной культуры при температуре 95 °С в течение 15 мин с последующими сериями разведений. Дальнейшее выделение отдельных колоний на твердой среде позволило получить бинарную культуру спорообразующих бактерий. Два палочковидных спорообразующих морфотипа разделили путем снижения рН среды до 3.17 с последующей серией разведений. Выделенную морфологически однородную культуру сульфидогенов обозначили штамм BuN1 (рис. 18). Анализ последовательности гена 16S рРНК показал, что штамм BuN1 относится к описанному недавно роду *Thermoanaerosceptrum*, представляющему удаленную ветвь внутри фирмикут

(рис. 19). Сходство последовательностей гена 16S рРНК с единственным известным видом, *T. fracticalcis*, составляло 97.6%.

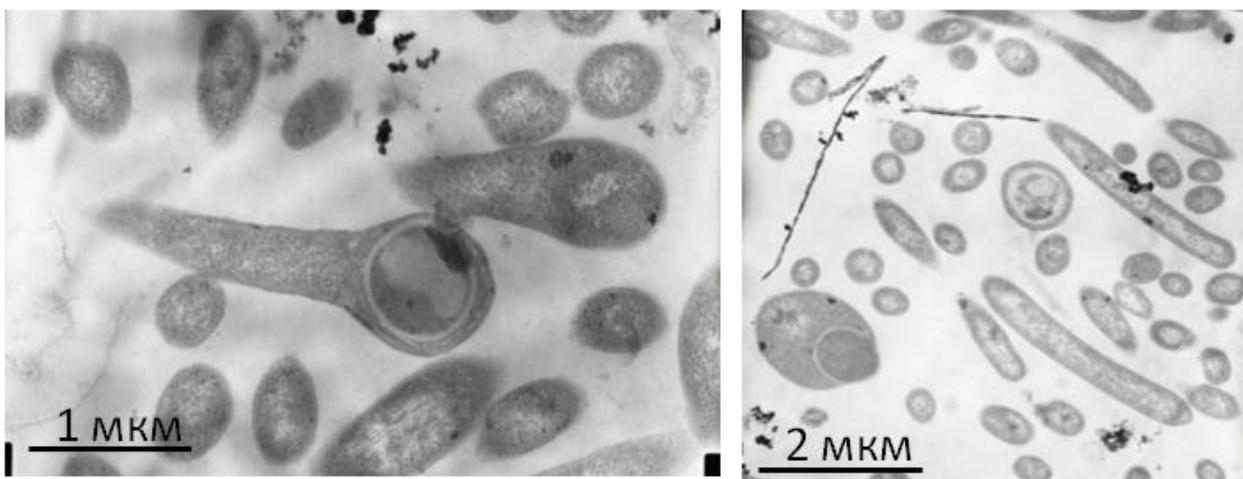


Рисунок 18. Клетки *Thermoanaeroseptrum sp. BuN1* (ТЭМ).

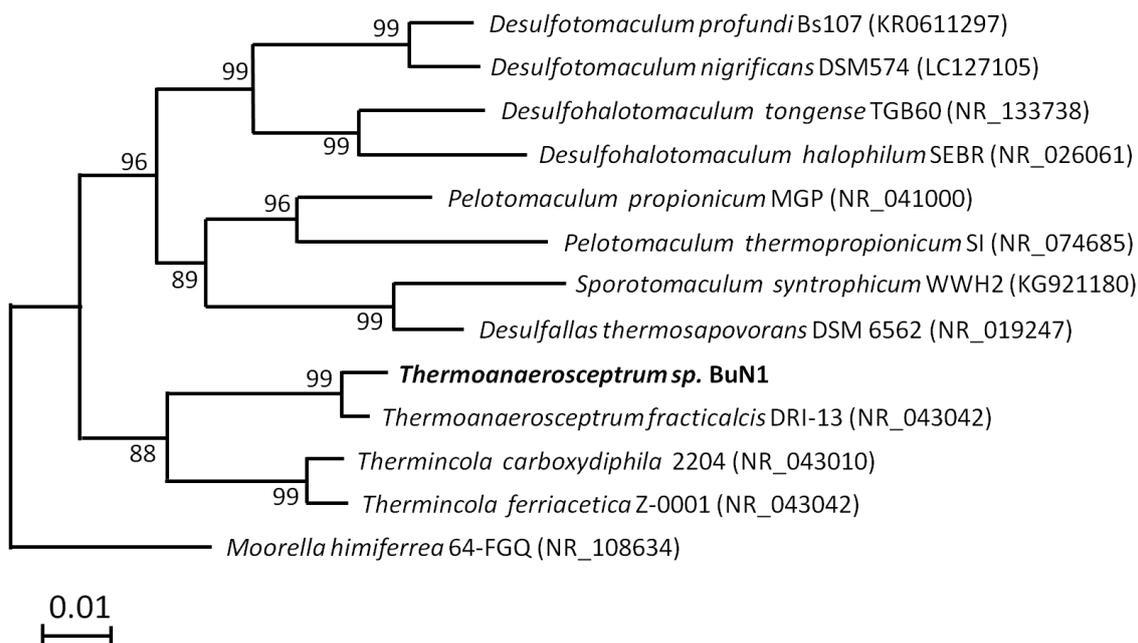


Рисунок 19. Филогенетическое положение штамма BuN1, построено на основе анализа последовательностей гена 16S рРНК с использованием программы FastTree (Price et al., 2009). Последовательности выровнены в онлайн сервисе SINA ACT (<https://www.arb-silva.de/aligner/>).

Штамм BuN1 существенно отличался от *T. fracticalcis* прежде всего способностью к восстановлению сульфата. Наряду с сульфатом штамм 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 наиболее активный рост BuN1 наблюдали на глюкозе, фруктозе и сахарозе. Неожиданно, максимальный рост штамм демонстрировал на среде с сахарозой, рост на фруктозе и глюкозе был слабее. Скорость роста на сахарозе составляла  $0.22 \text{ ч}^{-1}$ , время удвоения 3.2 ч (рис. 20). При достаточно высокой для анаэроба скорости роста штамм не накапливал значительной биомассы, численность клеток достигала  $2.5 \cdot 10^5$  кл/мл в конце экспоненциальной фазы. Содержание сероводорода увеличивалось с ростом численности клеток и составляло 25 мг/л после 60 ч культивирования. Максимальное содержание сероводорода, зафиксированное при культивировании, составляло 72 мг/л среды.

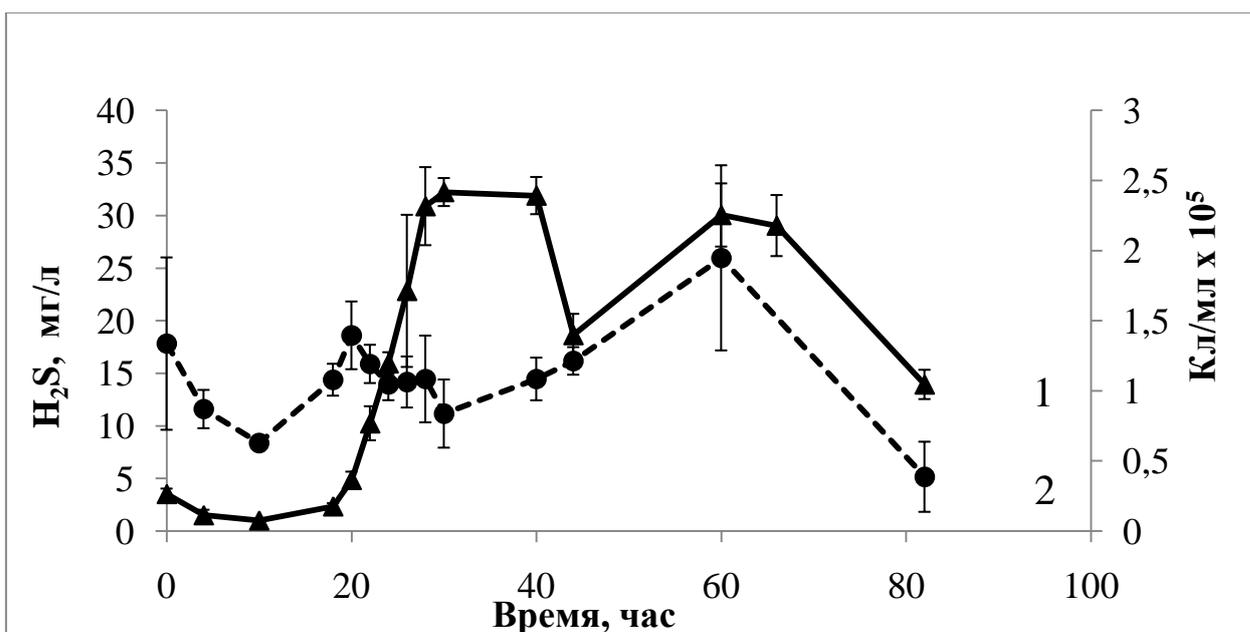


Рисунок 20. Динамика роста (1) *Thermoanaerobacterium* sp. BuN1 на сахарозе (2) изменение концентрации H<sub>2</sub>S в среде. Вертикальные линии показывают стандартное отклонение.

Штамм BuN1 не использует традиционные для сульфатредукторов доноры электронов – лактат и этанол, но хорошо растет на пирувате (таблица 7). Формиат и пропионат не поддерживали рост, как и фумарат, являющийся

единственным субстратом, позволяющим рутинно выращивать *T. fracticalcis* (Hamilton-Brehm et al., 2019). Глюкоза и пируват также поддерживали рост BuN1 в отсутствие сульфата. *Thermoanaerosceptrum* sp. BuN1 рос в узких пределах температуры от 37 до 55 °C с оптимумом при 50 °C. При этом штамм характеризовался широким диапазоном pH для роста от 2.8 до 9, с оптимумом 7.2. Максимальная концентрация NaCl в среде для роста составляла 0.5%. Сходство последовательностей гена 16S рРНК штамма BuN1 и *T. fracticalcis* DRI-13, составляет менее 98.7% – порога, разграничивающего виды (Chun et al., 2018).

Учитывая значительные различия в физиологии, очевидно, что штамм BuN1 является новым видом рода *Thermoanaerosceptrum*. Способность использовать сахара и восстанавливать соединения серы проясняет возможную роль этой группы в подземных горизонтах, как деструкторов микробной биомассы, образуемой хемолитотрофами. Подобный метаболизм соответствует обнаруженной Хамилтон-Брем и соавт. незначительной доли *Thermoanaerosceptrum* в сообществе подземных горизонтов (Hamilton-Brehm et al., 2019). Происхождение *Thermoanaerosceptrum* sp. BuN1 из подземной биосферы не вызывает сомнения, учитывая тот факт, что все известные из базы данных GenBank родственники являются представителями глубинных горизонтов, включая некультивируемую бактерию, обнаруженную в глубинных подземных водах, связанных с аккреционной призмой в Японии (Baito et al., 2015), и сообщество сульфидогенов из подземных термальных вод в Дании (Kjeldsen et al., 2007). Вызывает интерес тот факт, что при относительно активном росте на сахарозе BuN1 образовывал относительно небольшое количество сероводорода, что предполагает дополнительный источник энергии. Возможно, происходит одновременное сбраживание сахаров и использование промежуточных метаболитов в качестве донора электронов для сульфатредукции, как и предположили Хамилтон-Брем и соавт., обозначив их «криптическими» субстратами (Hamilton-Brehm et al., 2019). Определение

геномной последовательности *Thermoanaerobacterium* sp. BuN1 в совокупности с физиологическими экспериментами позволит понять метаболизм, а также изучить происхождение генов *dsr* в этом роде фирмикут (таблица 7). Возможно, что последовательность нуклеотидов какого-то из белков, связанных с сульфатредукцией, была нарушена у *T. fracticalcis* вставкой в хромосому бактериофага или другого мобильного элемента.

Таблица 7 – Сравнительная характеристика штаммов BuN1 и DRI-13<sup>T</sup>

<b>Характеристика</b>	<b>BuN1</b>	<b>DRI-13<sup>T</sup></b>
Морфология	палочки	палочки
Размер клеток (μм)	-	0.5·6.0
Подвижность	+	+
Споры	терминальная	центральная
Оптимальная температура (°C)	50	55
Границы температуры (°C)	37-60	35-65
Оптимум pH (границы)	7.2 (2.8-9.0)	8.0 (7.0-8.5)
Граница NaCl (мМ)	85	100

#### Доноры электронов и углерода

Формиат	-	-
Лактат	-	-
Пируват	+	-
Пропионат	-	-
Глюкоза	+	слабый рост
Фумарат	-	слабый рост
Фруктоза	слабый рост	нд
Мальтоза	-	нд
Сахароза	+	нд
Этанол	-	нд

#### Акцепторы электронов

SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	+	-
SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	+	-
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	+	-
S <sup>0</sup>	-	-
NO <sup>3-</sup>	слабый рост	-
Фумарат	-	+

### 3.6 Культивирование спирохет из подземной биосферы

Реконструирование геномов прокариот из метагенома (MAG), дает ключ к выделению чистых культур и улучшению культивирования, благодаря данным о метаболизме. В результате метагеномных исследований воды глубинных скважин 1-Р поселок Белый Яр и 5-Р село Чажемто в Томской области были идентифицированы филогенетически удаленные спирохеты, составляющие незначительную долю (0.8-2.0%) в микробном сообществе водоносного горизонта.

Первоначальная накопительная культура из воды скважины 1-Р получена на модифицированной среде WB с мальтозой. Накопительную культуру инкубировали при 50 °С и слабощелочном pH=8. Одиночные спирохетоподобные клетки наблюдали в накопительных культурах, где присутствовали сульфидогены, а накопление биомассы спирохетоподобных клеток было связано с продуцированием сульфидогенами H<sub>2</sub>S. Среда WB была разработана для сульфатредуцирующих бактерий и содержит сульфат в качестве акцептора электронов. Спирохеты росли только при совместном культивировании со спорообразующими палочковидными сульфидогенами, которые преобладали в накопительной культуре (рис. 21). Принимая во внимание прогнозируемую способность спирохеты из скважины 1-Р утилизировать крахмал, выделение чистой культуры проводили на базальной среде для спирохет, содержащей крахмал как единственный органический субстрат. Количество сульфида добавленного в среду в качестве восстановителя было увеличено до 96 г/л Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O. Сероводород, продуцируемый сульфидогенами при сокультивировании, явно способствовал росту спирохет. Культивирование на базовой среде для спирохет, привело к доминированию спирохетоподобных клеток в накопительной культуре. Чистая культура была выделена путем получения отдельных колоний молочно-белого цвета на твердой базальной среде и последовательными сериями разведений. Полученный чистый изолят спирохеты был обозначен NS. Рост штамма NS

оптимизировали путем увеличения количества восстановителя в два раза и добавления в пробирки для культивирования небольшого количества стерильного активированного угля. Амплифицированный ген 16S рРНК показал, что его последовательность полностью идентична той, что была собрана по данным метагенома. Таким образом, чистая культура спирохет была получена, несмотря на ее низкую долю в сообществе прокариот скважинных 1-Р.

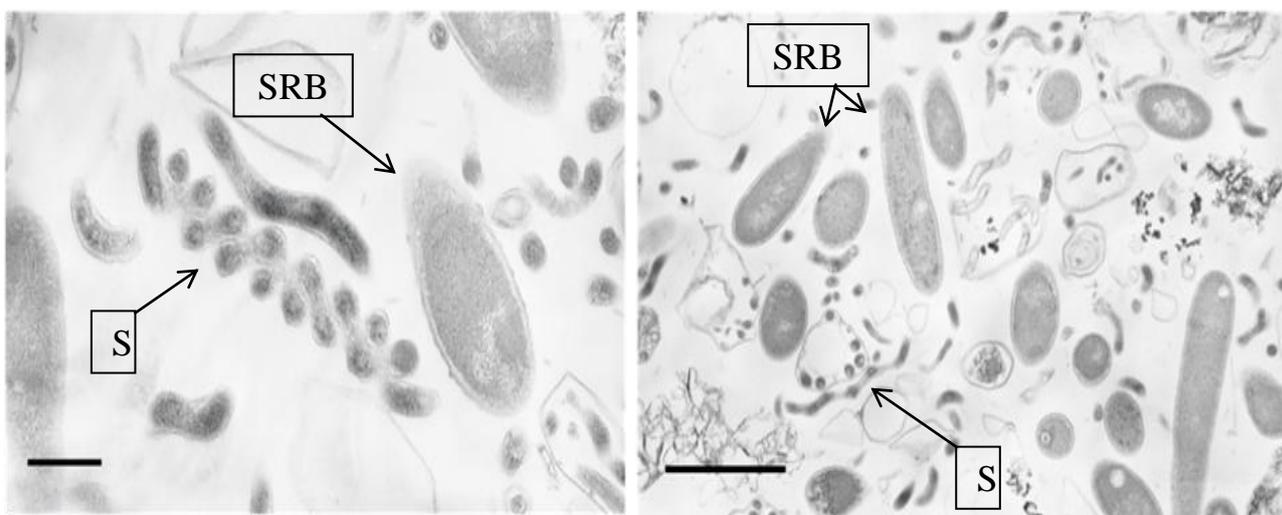


Рисунок 21. Микрофотографии (ТЭМ) накопительной культуры, содержащей спирохетоподобные клетки (S) и спорообразующие клетки сульфидогенов (SRB). Масштабная линейка составляет 0.5 мкм.

Морфология клеток штамма NS варьировала на разных стадиях роста, от классических подвижных спиралей (рис. 22) длиной до 50 мкм в свежей анаэробной базальной среде для спирохет до округлых тел (рис. 22) диаметром 1–1.5 мкм при стационарной фазе роста. Диаметр спиралей клеток штамма NS варьировал от 0.07 до 0.1 мкм. Штамм NS способен скручивать нити (рис. 22) и расти в виде слизистых пленок-матов на дне сосудов для культивирования.

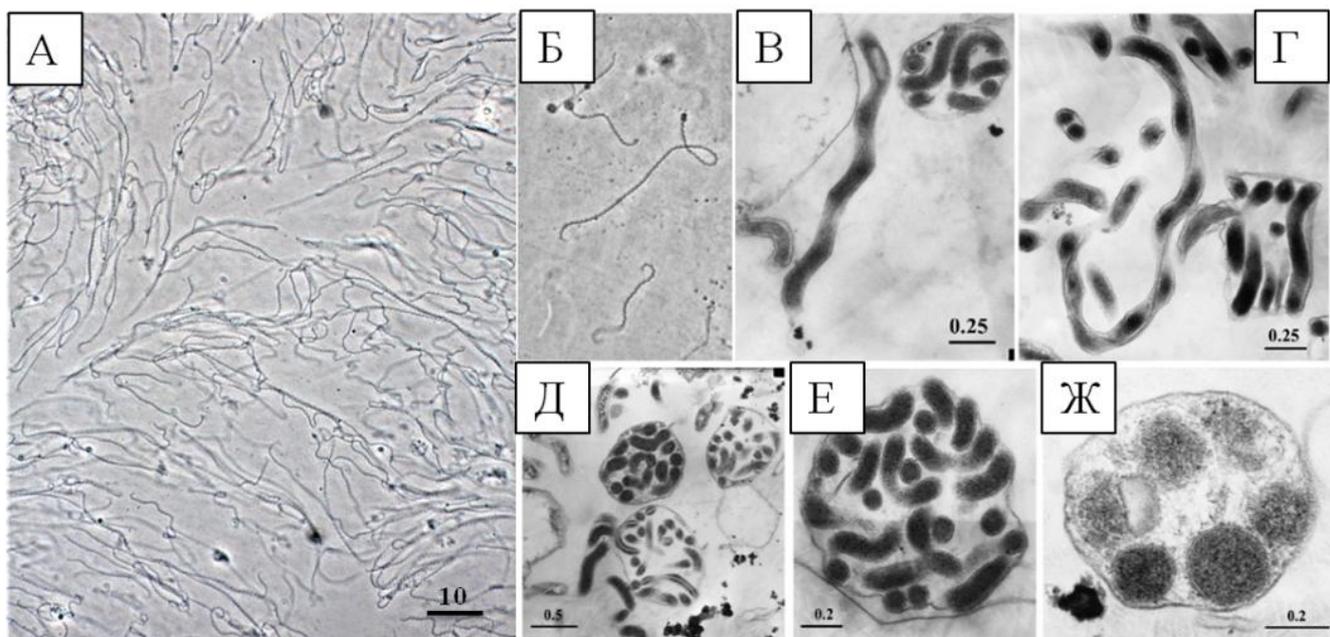


Рисунок 22. Фазово-контрастная микроскопия слизистого мата (А) клеток (Б) и микрофотографии (ТЭМ) ультратонких срезов клеток (В, Г) и округлых тел (Д-Ж) штамма NS. Масштаб в мкм.

Округлые тельца также были основным морфотипом, когда штамм NS рос на глюкозе и подвергался воздействию аэробных условий в течение 2 ч (рис. 22). Круглые тела превращались в спирали при возвращении в благоприятные условия для роста.

Штамм NS растет при pH 6.5-9.0, оптимальный рост при pH=8.0. Штамм не нуждается в добавлении NaCl в среду, а увеличение концентрации NaCl до 1 % приводит к удвоению продолжительности лаг-фазы и снижению количества клеток. Рост прекращается при концентрации NaCl более 1.2 %. Штамм NS рос при температуре от 37 до 65 °C, оптимум - 55 °C. Штамм NS использует узкий спектр органических субстратов, в том числе мальтозу, глюкозу и крахмал. Медленный рост отмечен на фруктозе, сахарозе, лактозе, раффинозе, галактозе и декстрине. NS не растет на арабинозе, рамнозе, хитине, хитозане, сорбитоле, микрокристаллической целлюлозе, карбокси-метилцеллюлозе, целлюлозе, этаноле, глицерине и манните.

Стратегия, разработанная для выделения штамма NS, была применена также для культивирования спирохет из скважины 5P в Чажемто. Начальная

накопительная культура получена на базальной среде для спирохет с добавлением крахмала, при 50 °С. Впоследствии была получена накопительная культура с преобладанием спирохет. Чистая культура спирохет получена выделением отдельной колонии на твердой базальной среде для спирохет с последующей серией разведений. Последовательность гена 16S рРНК штамма, обозначенного N5R, была на 100% идентична последовательности, полученной на основе метагенома.

Штамм N5R, был способен расти при pH от 3.5 до 9.0, оптимум 7.5. Оптимальный рост наблюдался без добавления NaCl в питательную среду. Штамм может выдерживать до 1% NaCl, при 2% NaCl рост прекращался. N5R растет при температуре 37–65 °С, оптимум 50 °С. Оптимальный субстрат 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.

Идентичность аминокислотного состава генома (AAI) штамма NS и ближайшего валидного и культивируемого представителя *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).

Филогенетическое положение штаммов NS и N5R также было проанализировано путем построения филогенетического дерева на основе конкатенированных последовательностей 120 консервативных бактериальных маркерных генов. Штамм NS, по-видимому, сформировала отдельную линию на уровне семейства в классе *Brevinematia*, сестринскую по отношению к представителям GWF1-51-8 и *Brevinema andersonii* (рис.23).

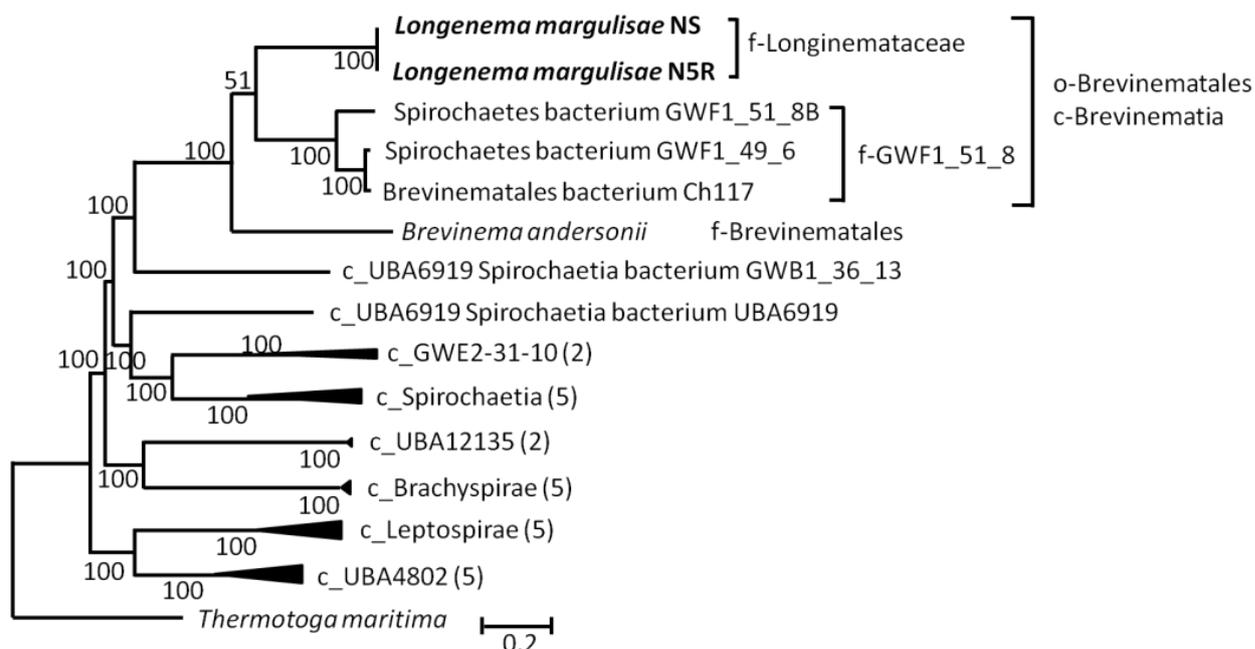


Рисунок 23. Филогенетическое дерево, основанное на сравнении конкатенированных последовательностей 120 консервативных бактериальных маркерных генов, определенное методом Maximum Likelihood и показывающее положение штаммов NS и N5R (выделены жирным шрифтом) по отношению к другим представителям филума *Spirochaetes*.

На основании физиологии и геномных данных штамм NS был описан как типовой штамм нового вида '*Longinema . margulisiae*' sp. nov.

**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<sub>2</sub>S. Свободноживущие. Типовым видом является '*L. margulisiae*' NS<sup>T</sup>.

**Описание '*L. margulisiae*' sp. nov.** '*Longinema margulisiae*' (mar.gu.lis'i.ae. N.L. gen. Fem. n. margulisiae of Margulis, назван в честь Линн Маргулис). Название вида дано в честь Линн Маргулис за ее вклад в области

изучения биологии спирохет. Температурный диапазон роста 37 – 65 °С с оптимумом 50 – 55 °С. 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<sup>T</sup> (ВКМ В-3452<sup>T</sup>) 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*.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Род *Thermodesulfovibrio* описан в 1994 г. после выделения *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, из гидротермального источника в озере Йеллоустоун (Henry et al., 1994). Позднее из наземных горячих источников в Исландии и Тунисе были выделены еще два вида, *T. islandicus* (Sonne-Hansen and Ahring, 1999) и *T. hydrogeniphilus* (Haouari et al., 2008). Представители рода *Thermodesulfovibrio* принадлежат к филуму *Nitrospirae*. Филум *Nitrospirae* в настоящее время включает в себя 3 рода: *Nitrospira* - выполняют окисление нитрита, *Leptospirillum* - окисляют железо и единственными известными СРБ в филуме *Nitrospirae* являются бактерии, принадлежащие к роду *Thermodesulfovibrio*. Специфические нуклеотидные последовательности *Thermodesulfovibrio* были обнаружены в системах глубоких водоносных горизонтов Большого Артезианского бассейна, Австралия (Kimura et al., 2005), в пластовых водах и нефти из нескольких резервуаров в Китае (Nazina et al., 2006; Wang et al., 2014; Yang et al., 2016) и в глубоких гранитных грунтовых водах на полигоне Гримзель, Швейцария (Konno et al., 2013). Все описанные виды рода *Thermodesulfovibrio* термофильные; их общие метаболические свойства включают восстановление сульфата, тиосульфата и, в некоторых случаях, сульфита с ограниченным набором доноров электронов (Henry et al., 1994; Sonne-Hansen, Ahring, 1999; Haouari et al., 2008; Sekiguchi et al., 2008). Донорами электронов служат пируват и лактат, которые представители рода не полностью окисляют до ацетата, или  $H_2$  и формиат с добавлением ацетата в качестве вспомогательного источника углерода. Неспособность к автотрофному росту и неполное окисление органических субстратов до ацетата - характерные черты рода *Thermodesulfovibrio*. Альтернативными акцепторами электронов, используемыми *Thermodesulfovibrio* spp. могут быть Fe(III), а в случае *Thermodesulfovibrio islandicus* DSM 12570 - нитрат (Henry et al., 1994; Sonne-Hansen, Ahring, 1999; Haouari et al., 2008; Sekiguchi et al., 2008). Представители рода *Thermodesulfovibrio*, охарактеризованные на сегодняшний

день, являются нейтрофилами. *Thermodesulfovibrio* sp. N1, выделенный нами из воды скважины 1-Р, является первым умеренно алкалофильным представителем рода.

‘*Desulforudis audaxviator*’ был обнаружен при секвенировании ампликонов 16S рРНК в воде нефтепоисковой скважины 1-Р (п. Белый Яр, Томская обл.), вскрывающей глубинный водоносный горизонт (Kadnikov et al., 2018). Следует отметить, что объем воды, использованный для первоначальных неудачных попыток культивирования составлял 1 мл, в то время как для секвенирования было профильтровано 50 л. Последующее удачное культивирование СДА может быть обусловлено несколькими причинами. Сдвиг рН до 8.0 в накопительных культурах 2014 г. мог способствовать успешному выделению и культивированию штамма ВУФ. Добавление элементного железа сыграло важную роль в культивировании штамма ВУФ. Рост штамма отсутствовал в вариантах экспериментов с различными донорами электронов, если в среду не добавляли железо. Элементное железо успешно использовали ранее для выращивания СРП (Карначук и соавт., 2006). Возможно несколько причин влияния железа на культивирование:

1. из элементного железа образуется  $H_2$  в анаэробных условиях, который может быть использован в качестве донора электронов:



Однако штамму ВУФ требовалось элементное железо также и при выращивании в среде, содержащей  $H_2$ .

2. Сульфидогены, могут быть лимитированы содержанием железа в среде. Железо может выпадает в осадок, в форме сульфида и быть недоступным для клеток. Элементное железо может служить микроисточником железа в сульфидсодержащих средах. Важность железа для бактерии подтверждается наличием как транспортеров Fe(III) ABC типа сидерофор / гем / витамин B12 в

геноме штамма ВУФ, так и железо-подобных транспортных систем Fe(II), каждая из которых кодируется в нескольких копиях.

3. Также нельзя исключать тот факт, что элементарное железо поглощает сульфид и снижает его токсичность для клеток. Мы обратили внимание, что добавление кадмия в концентрации 25 мг/л увеличивало выход биомассы клеток штамма ВУФ. Возможная роль кадмия может заключаться в уменьшении концентрации растворенного H<sub>2</sub>S путем осаждения его в форме сульфида кадмия.

4. Кроме того, нельзя исключить возможность прямого использования электронов металлического железа штаммом ВУФ, как первоначально сообщалось для *Desulfovibrio* (Dinh et al., 2004) и продемонстрировано для *Desulfovibrio ferrophilus* (Deng and Okamoto, 2018). Прямое извлечение электронов из твердых субстратов было описано, как важный путь получения энергии в низкоэнергетических подземных экосистемах (Deng and Okamoto, 2018). Возможно, металл, используемый для обсадной колонны скважины 1-Р, мог служить источником железа для клеток штамма ВУФ и таким образом «концентрировать» его. В ствол скважины были установлены различные обсадные колонны, от поверхностной направляющей трубы диаметром 18 дюймов и обсадной колонны 14 дюймов до последней колонны обсадных труб диаметром 5 дюймов в продуктивных водоносных горизонтах.

Заметным морфологическим признаком клеток штамма ВУФ были газовые вакуоли, которые присутствовали только в спорулирующих клетках. Заполненные газом вакуоли, как известно, придают клеткам плавучесть (Pfeifer, 2012). Таким образом, споры '*D. audaxviator*', связанные с газовыми везикулами, могут представлять механизм, который позволяет штамму распространяться на большие расстояния. В одном из ранних исследований *Desulfotomaculum*, сообщалось о спорах, связанных с газовыми пузырьками (Widdel, Pfennig 1981). Последующие исследования показали, что споры *Desulfotomaculum* могут выжить в суровых температурных условиях и

распространяться в холодные морские отложения из горячих подповерхностных высачиваний в рифтовых зонах (O'Sullivan et al., 2015).

Выделение в чистую культуру и физиологические эксперименты со штаммом BYF подтвердили положения, сделанные на основе анализа генома CDA MP104 (Chivian et al., 2008). Штамм BYF - термофильный хемолитоавтотроф, способный к сульфатредукции и гидрогенотрофии. Кроме того, штамм BYF использует широкий спектр доноров электронов для восстановления сульфата. Таким образом, '*D. audaxviator*' хорошо приспособлен для переключения источника «топлива» и может не только автотрофно расти, когда доступен  $H_2$ , но также потребляет органические кислоты, спирты или сахара. В целом, обе экосистемы, содержащие '*D. audaxviator*', фракционная вода шахты Мпоненг и водоносный горизонт, вскрытый скважиной 1-Р, имеют похожее происхождение (смесь реликтовой и метеорной воды) и гидрохимические характеристики. Термальная (40–60 °С) вода, зарегистрированная для обеих экосистем, является восстановленной, щелочной, соленой и содержит  $H_2S$  и метан. Разница заключается в концентрации сульфата, которая варьирует в воде трещины Мпоненг от 50.8 до 178 мг/л (Lin et al., 2006), но не превышает предел обнаружения 5 мг/л в воде из скважины 1-Р (Kadnikov et al., 2018). Низкая концентрация сульфатов в сибирском водоносном горизонте поднимает вопрос о большом количестве сульфатредуцирующих консорциумов, выявленных в водоносном горизонте метагеномными исследованиями, которые включали *Desulfobacca*, *Desulfotomaculum*, '*Candidatus Desulforudis audaxviator*' BYF и *Thermodesulfovibrio* sp. N1 (Frank et al., 2016; Kadnikov et al., 2018). Интересно, что мы смогли культивировать и изолировать в чистой культуре не только '*D. audaxviator*' BYF и *Thermodesulfovibrio* sp. N1, но также чистую культуру близкого родственника *Desulfotomaculum profundum* и представителей рода *Desulfobacca* в накопительной культуре (Frank et al., Неопубликовано). Все эти культуры были изолированы с сульфатом в качестве акцептора электронов.

Возможны несколько объяснений появления большого количества сульфатредуцирующих консорциумов в воде низкосульфатного водоносного горизонта – бактерии могут использовать альтернативные, акцепторы электронов. '*D. audaxviator*' ВУФ может использовать фумарат, но не Fe, концентрация которого относительно высока в воде скважины 1-Р. СРП могут использовать твердофазные акцепторы электронов, такие как гипс, ханнебахит, англезит или барит (Karnachuk et al., 2002). Наши эксперименты показали, что штамм ВУФ может расти с баритом или целестином. Задokumentировано присутствие барита в породах баженовской свиты (Kontorovich et al., 2016). Концентрация бария в воде 1-Р недостаточно высока, чтобы предположить, что барит способствует восстановлению сульфатов в водоносном горизонте. Однако в образцах воды 1-Р были обнаружены повышенные концентрации стронция от 0.946 до 1.011 мг/л. Высокое содержание стронция до 500 мг/л - известная характеристика Западно-Сибирского мегабассейна (Novikov, Shvartsev, 2009). Также возможно, что концентрация сульфата могла быть выше в поровых водах вмещающей породы из-за окисления таких минералов, как пирит, высокое содержание которого зафиксировано в баженовской свите (Kontorovich et al., 2016). Сульфат также может оставаться незамеченным в реликтовых морских водах, локализованных в пространственно изолированных частях водоносной системы, богатых сульфатами.

Определение полной последовательности генома штамма ВУФ позволило сравнить его с геномом штамма MP104. Обнаружено удивительно высокое сходство, как на уровне структуры генома, так и на уровне вариаций точечных нуклеотидных последовательностей. Обнаружение почти идентичных локусов CRISPR, известных как один из наиболее быстро развивающихся элементов прокариотических геномов (Tyson and Banfield., 2008), у двух штаммов также было неожиданным.

Вероятно, есть два не исключаящих друг друга объяснения высокого генетического сходства между сибирскими и южноафриканскими штаммами

'*D. audaxviator*'. Первый - это медленная эволюция микроорганизмов глубинной подповерхностной биосферы, процветающих в условиях ограничения энергии. Время генерации в таких средах может достигать сотен и тысяч лет (Phelps et al., 1994; Jørgensen and D'Hondt., 2006; Lomstein et al., 2012). Однако, в отличие от южноафриканского золотого рудника, глубокий подземный водоносный горизонт в Западной Сибири не является бедной органикой средой и является местом обитания разнообразного микробного сообщества со значительной долей гетеротрофов (Kadnikov et al., 2018). Время удвоения штамма ВУФ в оптимальных условиях роста составляло около 29 ч, что свидетельствует о возможности его быстрого роста в естественной среде, когда питательные вещества доступны в избытке.

Вторым объяснением может быть относительно быстрое глобальное распространение '*D. audaxviator*'. Его споры, содержащие газовые вакуоли с улучшенной плавучестью, могут представлять механизм, который позволяет CDA распространяться на большие расстояния и колонизировать подземную среду, где он может конкурировать с другими прокариотами из-за своего особого стиля питания, как это наблюдается в южноафриканской шахте. CDA может происходить из глубоких недр суши и может быть доставлен на поверхность с выбросом грунтовых вод. На поверхности микроорганизмы могут распространяться на большие расстояния, например, с атмосферными аэрозолями (Smith et al., 2013). Колонизация новых наземных и подземных сред CDA может произойти через сброс метеорных вод в более глубокие горизонты.

Глубокие подземные среды считались экосистемами, в которых обитают медленно растущие прокариоты из-за крайнего ограничения энергии. Наше исследование показало, что типичный подземный организм может адаптироваться к относительно быстрому росту в условиях, богатых питательными веществами. Чрезвычайно низкие скорости метаболизма и время генерации, приписываемые CDA, представляют собой только «одну сторону

медали», организм довольно гибок и может переключаться на разные источники энергии и модели роста.

В местах излива глубинных скважин на поверхность могут формироваться своеобразные термальные биотопы, где дефицитные по органическому веществу, но богатые минеральными соединениями высокотемпературные воды получают доступ к свету и кислороду. Здесь формируются высокопродуктивные сообщества, в которых органика образуется за счет фотосинтеза и/или хемосинтеза, основанного на окислении восстановленных соединений серы, приносимых из глубинных пластов. Микробные маты на изливе термальных скважин могут служить своеобразными накопителями глубинных организмов, прежде всего, спорообразующих. Одной из причин, не позволяющих культивировать глубинные прокариоты непосредственно из воды скважин, является их низкое содержание в пробах воды. Особенное значение это имеет в случае выделения минорных компонентов сообщества. Накопление клеток, или, что более вероятно, спор в микробных матах позволяет получить сконцентрированный инокулят для постановки первичных накопительных культур. Маты фактически являются природной “ловушкой” для некоторых микроорганизмов.

Ранее проведенные исследования по молекулярной детекции прокариот в глубоко залегающих геотермальных водах Сибири указывают на доминирование филогенетически удаленных *Firmicutes* в составе микробных сообществ (Frank et al., 2016). Являясь характерной группой для подземной биосферы, фирмикуты могут играть важную роль в трофических связях внутри микробных сообществ подземных горизонтов. Однако к настоящему времени выделены в чистые культуры из геотермальных экосистем и валидно описаны лишь единичные грамположительные спорообразующие сульфатредукторы, главным образом *Desulfotomaculum*. Спорообразующие сульфатредуцирующие бактерии, до недавнего времени объединяемые в род *Desulfotomaculum*, являются типичными обитателями подземных термальных биотопов (Aüllo et

al., 2013; Frank et al., 2016). Образование спор, способность к автотрофии и устойчивость к высоким температурам позволяет этой группе успешно колонизовать глубинные воды. В 2018 г. была проведена ревизия *Desulfotomaculum*, в результате которой выделены четыре новых рода *Desulfallas*, *Desulfofundulus*, *Desulfofarcimen* и *Desulfohalotomaculum* (Watanabe et al., 2018).

В 2019 г. был описан новый род *Thermoanaerosceptrum*, филогенетически удаленный от таксономически описанных представителей *Firmicutes*. 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. Полученная нами чистая культура *Thermoanaerosceptrum* sp. BuN1 восстанавливает сульфаты и характеризуется сахаролитической активностью, а также ростом в широком диапазоне pH от 3.5 до 9. Штамм BuN1 является умеренным термофилом с оптимумом 50°C и растет в интервале от 37 до 60 °C.

## 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 группы представляет трудности. Наши исследования показали, что представители рода *Thermodesulfovibrio* (филум *Nitrospirae*) хорошо поддаются культивированию и являются «легким» объектом для выделения в чистую культуру. Нами выделен первый алкалотолерантный представитель рода, *Thermodesulfovibrio* sp. N1. Все охарактеризованные на сегодняшний день представители рода *Thermodesulfovibrio* являются нейтрофилами. 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 и выявил способность к сульфатредукции и гидрогенотрофному росту. Мы впервые культивировали эту бактерию из подземных термальных вод Мезозойских отложений в Томской области. ‘*Desulforudis audaxviator*’ штамм ВУФ был выделен в чистую культуру. Создание специальной среды, дефицитной по кальцию и фосфору и содержащей полиамин спермидин, позволило культивировать организм в лабораторных условиях со скоростями роста сопоставимыми с другими сульфидогенами филума *Firmicutes*. Изучение физиологии штамма ВУФ

продemonстрировало 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 ВУФ. Разработана среда и оптимизированы условия культивирования штамма ВУФ, 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 *Longineta margulisiae* sp. nov., нового рода *Longineta* и нового семейства *Longinemataceae*.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- 16S рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота;
- WB – основная среда Видделя-Бака;
- CDA - '*Candidatus D. audaxviator*';
- Dsr – диссимиляционная сульфитредуктаза;
- ICP-MS – масспектральный анализ с индуктивно связанной плазмой;
- SEM – сканирующая электронная микроскопия;
- XRD – рентгенофазовый анализ;
- ДГГЭ – денатурирующий градиентный гель-электрофорез;
- п.н. – пар нуклеотидов;
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- ПЦР-ДГГЭ – разделение амплифицированных фрагментов ДНК в денатурирующих условиях;
- СРБ – сульфатредуцирующие бактерии;
- СРП – сульфатредуцирующие прокариоты;
- ТАЕ-буфер – трис-ацетатный электродный буфер;
- ТЕМ - трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия;
- ЭДС (EDS) – энергодисперсионный анализ;

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alain K., Querellou J. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges // *Extremophiles*. – 2009. – Vol. 13(4). – P. 583–594.
2. Amann J. Die direkte Zählung der Wasserbakterien mittels des Ultramikroskops // *Centralbl f Bakteriol.* – 1911. – Vol. 29. – P. 381–384.
3. Amann R., Rossello-Mora R. After all, only millions? // *mBio*. – 2016. – Vol. 7(4). – Article e00999-16. – DOI:10.1128/mBio.00999-16
4. Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // *Microbiol. Rev.* – 1995. – Vol. 59(1). – P. 143–169.
5. Aüllo T., Ranchou-Peyruse A., Ollivier B., Magot M. *Desulfotomaculum* spp. and related gram-positive sulfate-reducing bacteria in deep subsurface environments // *Front. Microbiol.* – 2013. – Vol. 4. – № 7. – Article 362.
6. Badalamenti J.P., Summers Z.M., Chan C., Gralnick J.A., Bond D.R. Isolation and genomic characterization of '*Desulfuromonas soudanensis* WTL', a metal- and electrode-respiring bacterium from anoxic deep subsurface brine // *Front. Microbiol.* – 2016. – Vol. 5. – Article 913.
7. Baito K., Imai S., Matsushita M., Otani M., Sato Y., Kimura H. Biogas production using anaerobic groundwater containing a subterranean microbial community associated with the accretionary prism // *Microb. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 8(5). – P. 837-845.
8. Barton L., Hamilton W. Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems // Cambridge University Press. – 2007. – DOI:10.1017/CBO9780511541490.

9. Bastin E.S., Greer F.E., Merritt C., Moulton G. The presence of sulphate reducing bacteria in oil field waters // *Science*. – 1926. – Vol. 63. – P. 21–24.
10. Bell E., Lamminmäki T., Alneberg J., Andersson A.F., Qian C., Xiong W., Hettich R.L., Balmer L., Fruttschi M., Sommer G., Bernier-Latmani R. Biogeochemical cycling by a low-diversity microbial community in deep groundwater // *Front. Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – Article 2129. – doi: 10.3389/fmicb.2018.02129.
11. Ben-Dov E., Kramarsky-Winter E., Kushmaro A. An in situ method for cultivating microorganisms using a double encapsulation technique // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2009. – Vol. 68(3). – P. 363–371.
12. Berlendis S., Ranchou-Peyruse M., Fardeau M.-L., Lascourrèges J.-F., Joseph M., Ollivier B., Aüllo T., Dequidt D., Magot M., Ranchou-Peyruse A. *Desulfotomaculum aquiferis* sp. nov. and *Desulfotomaculum profundum* sp. nov., isolated from a deep natural gas storage aquifer // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2016. – Vol. 66(11). – P. 4329-4338.
13. Boitard L., Cottinet D., Bremond N., Baudry J., Bibette J. Growing microbes in millifluidic droplets // *Engineering in Life Sciences*. – 2015. – Vol. 15. – № 3. – P. 318–326.
14. Bomberg M., Nyysönen M., Pitkänen P., Lehtinen A., Itävaara M. Active microbial communities inhabit sulphate-methane interphase in deep bedrock fracture fluids in Olkiluoto, Finland // *BioMed Research International* – 2015. – Vol. 2015. – Article 979530. – doi: 10.1155/2015/979530.
15. Boylan A.A., Perez-Mon C., Guillard L., Burzan N., Loreggian L., Maisch M., Kappler A., Byrne J.M., Bernier-Latmani R. H<sub>2</sub>-fuelled microbial metabolism in Opalinus Clay // *Applied Clay Science*. – 2019. – Vol. 174. – P. 69–76.
16. Buerger S., Spoering A., Gavrish E., Leslin C., Ling L., Epstein S.S. Microbial scout hypothesis, stochastic exit from dormancy, and the nature of slow growers //

- Applied and Environmental Microbiology. – 2012. – Vol. 78. – № 9. – P. 3221–3228.
17. Butkevich N.V., Butkevich V.S. Multiplication of sea bacteria depending on the composition of the medium and on temperature // Microbiology. – 1936. – Vol. 5. – P. 322–343.
18. Butkevich V.S. Methodik der bakteriologischen meeresuntersuchungen und einige Angaben über die Verteilung der bakterien im wasser und in dem boden des barents meeres // Trans. Oceanogr. Inst. (Moscow). – 1932. – Vol. 2. – P. 5–9.
19. Chapelle F.H., O'Neill K., Bradley P.M., Methé B.A., Ciufo S.A., Knobel L.L., Lovley D.R. A hydrogen-based subsurface microbial community dominated by methanogens // Nature. – 2002. – Vol. 415. – P. 312-315.
20. Chattopadhyay M.K., Tabor C.W., Tabor H. Polyamines protect *Escherichia coli* cells from the toxic effect of oxygen // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2003. – Vol. 100. – P. 2261–2265.
21. Chernyh N.A., Neukirchen Sinje, Frolov E.N., Sousa F.L., Miroshnichenko M.L., Merkel A.Y., Pimenov N.V., Sorokin D.Y., Ciordia S., Mena M. C., Ferrer Manuel, Golyshin Peter N., Lebedinsky A.V., Cardoso P.I.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. Dissimilatory sulfate reduction in the archaeon '*Candidatus Vulcanisaeta moutnovskia*' sheds light on the evolution of sulfur metabolism // Nature Microbiology. – 2020. – Vol. 5. – P. 1428–1438.
22. Chivian D., Brodie E.L., Alm E.J., Culley D.E., Dehal P.S., DeSantis T.Z., Gihring T.M., Lapidus A., Lin L., Lowry S.R., Moser D.P., Richardson P.M., Southam G., Wanger G., Pratt L.M., Andersen G.L., Hazen T.C., Brockman F.J., Arkin A.P., Onstott T.C. Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within Earth // Science. – 2008. – Vol. 322. – P. 275 - 278.

23. Cholodny N. Zur methodik der quantitativen erforschung des bakteriellen planktons. zentralbl // Bakteriolog. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. – 1929. – Vol. 77. – P. 179-193.
24. Chun J., Lee J.H., Jung Y., Kim M., Kim S., Kim B.K., Lim Y.W. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences // Int. J. System. Evol. Microbiol. – 2007. – Vol. 57(10). – P. 2259-2261.
25. Cline J. D. Spectrophotometric determination of hydrogen sulphide in natural waters // Limnol. Oceanogr. – 1969. – Vol. 14. – P. 454-458.
26. Colman D.R., Poudel S., Stamps B.W., Boyd E.S., Spear J.R. The deep, hot biosphere: Twenty-five years of retrospection // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2017. – Vol. 114. – № 27. – P. 6895–6903.
27. Colwell R.R., Grimes D.J. Nonculturable microorganisms in the environment // ASM Press. – 2000. – doi: 10.1007/978-1-4757-0271-2\_1.
28. Dale C., Beeton M., Harbison C., Jones T., Pontes M. Isolation, pure culture, and characterization of "*Candidatus Arsenophonus arthropodicus*", an intracellular secondary endosymbiont from the hippoboscid louse fly *Pseudolynchia canariensis* // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – Vol. 72(4). – P. 2997-3004.
29. Daumas S., Cord-Ruwisch R., Garcia J.L. *Desulfotomaculum geothermicum* sp. nov., a thermophilic, fatty-acid degrading, sulfate-reducing bacterium isolated with H<sub>2</sub> from geothermal ground water // Antonie van Leeuwenhoek. – 1988. – Vol. 54(2). – P. 165-178.
30. DeLong E. F. Archaea in costal marine environments // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1992. – Vol. 89(12). – P. 5685-5689.

31. Deng X., Okamoto A. Electrode potential dependency of singlecell activity identifies the energetics of slow microbial electron uptake process // *Front. Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – Article 2744. – DOI:10.3389/fmicb.2018.0274440.
32. Dinh H.T, Kuever J., Mussmann M., Hassel A.W., Stratmann M., Widdel F. Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms // *Nature.* – 2004. – Article 427. – P. 829-32. – DOI:10.1038/nature02321.
33. Edwards K.J., Keir B., Colwell F. The Deep, Dark Energy Biosphere: Intraterrestrial Life on Earth // *Annual Review of Earth and Planetary Sciences.* – 2012. – Vol. 40(1). – P.551-568.
34. Epstein S.S. The phenomenon of microbial uncultivability // *Current Opinion in Microbiology.* – 2013. – Vol. 16(5). – P. 636 – 642. – DOI:10.1016/j.mib.2013.08.003.
35. Epstein S.S. Uncultivated Microorganisms // Part of the Microbiology Monographs book series (MICROMONO, volume 10). – 2009. – DOI: 10.1007/978-3-540-85465-4.
36. Escudero C., Oggerin M., Amils R. The deep continental subsurface: the dark biosphere // *Int Microbiol.* – 2018. – Vol. 21(1-2). – P. 3-14. – DOI:10.1007/s10123-018-0009-y.
37. Frank Y.A., Kadnikov V.V., Gavrilov S.N., Banks D., Gerasimchuk A.L., Podosokorskaya O.A., Merkel A.Y., Chernyh N.A., Mardanov A.V., Ravin N.V., Karnachuk O.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. Stable and variable parts of microbial community in Siberian deep subsurface thermal aquifer system revealed in a long-term monitoring study // *Front Microbiol.* – 2016. – Vol. 7. – Article 2101. – DOI:10.3389/fmicb.2016.02101.
38. Fredrickson J.K., Hicks R.J. Probing reveals many microbes beneath earth's surface // *ASM News.* – 1987. – Vol. 53. – P. 78-79.

39. Gadd G.M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation // *Microbiology*. – 2010. – Vol. 156(3). – P. 609 - 643.
40. Gao W., Navaroli D., Naimark J., Zhang W., Chao S., Meldrum D.R. Microbe observation and cultivation array (MOCA) for cultivating and analyzing environmental microbiota // *Microbiome*. – 2013. – Vol. 1. – Article 4.
41. Ghiorse W.C., Wilson J.T. Microbial ecology of the terrestrial subsurface // *Adv. Appl. Microbiol.* – 1988. – Vol. 33. – P.107-172.
42. Gold T. The deep, hot biosphere // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* –1992. – Vol. 89. – P. 6045-6049.
43. Graham E.B., Knelman J.E., Schindlbacher A., Siciliano S., Breulmann M., Yannarell A., Beman J.M., Abell G., Philippot L., Prosser J., Foulquier A., Yuste J.C., Glanville H.C., Jones D.L., Angel R., Salminen J., Newton R.J., Bürgmann H., Ingram L.J., Hamer U., Siljanen H.M.P., Peltoniemi K., Potthast K., Bañeras L., Hartmann M., Banerjee S., Yu R., Nogaro G., Richter A., Koranda M., Castle S.C., Goberna M., Song B., Chatterjee A., Nunes O.C., Lopes A.R., Cao Y., Kaisermann A., Hallin S., Strickland M.S., Garcia-Pausas J., Barba J., Kang H., Isobe K., Papaspyrou S., Pastorelli R., Lagomarsino A., Lindström E.S., Basiliko N., Nemergut D.R. Microbes as engines of ecosystem function: when does community structure enhance predictions of ecosystem processes? // *Front. Microbiol.* – 2016. – Vol. 5. – Article 214.
44. Gramp J.P., Sasaki K., Bigham J.M., Karnachuk O.V., Tuovinen O.H. Formation of covellite (CuS) under biological sulfate-reducing conditions // *Geomicrobiology*. – 2008. – Vol. 25. – № 5. – P. 219-227.
45. Gutleben J., Mares M. C., Elsas J. D., Smidt H., Overmann J., Sipkema D. The multi-omics promise in context: from sequence to microbial isolate // *Critical Reviews in Microbiology*. – 2018. – Vol. 44. – № 2. – P. 212-229.

46. Haferburg G., Kothe E. Microbes and metals: interactions in the environment // Journal of Basic Microbiology. – 2007. – Vol. 47(6). – P. 453 – 467.
47. Hamana K., Itoh T., Sakamoto M., Hayashi H. Covalently linked polyamines in the cell wall peptidoglycan of the anaerobes belonging to the order *Selenomonadales* // J. Gen. Appl. Microbiol. – 2012. – Vol. 58(4). – P. 339-347.
48. He X., McLean J.S., Edlund A., Yooseph S., Hall A.P., Liu S.Y., Dorrestein P.C., Esquenazi E., Hunter R.C., Cheng G., Nelson K.E., Lux R., Shi W. Cultivation of a human-associated TM7 phylotype reveals a reduced genome and epibiotic parasitic lifestyle // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2015. – Vol. 112 (1). – P. 244-249.
49. Hermsdorf A.W., Amano, Y., Miyakawa, K., Ise, K., Suzuki, Y., Anantharaman, K., Probst A., Burstein D., Thomas B.C., Banfield J.F. Potential for microbial H<sub>2</sub> and metal transformations associated with novel bacteria and archaea in deep terrestrial subsurface sediments // ISME J. – 2017. – Vol. 11. – P. 1915-1929.
50. Hesselman M.C., Odoni D.I., Ryback B.M., De Groot S., Van Heck R.G.A., Keijsers J., Kolkman P., Nieuwenhuijse D., Van Nuland Y.M., Sebus E., Spee R., De Vries H., Wapenaar M.T., Ingham C.J., Schroe K., Martins dos Santos V.A.P., Spaans S.K., Hugenholtz F., Van Passel M.W.J. A multi-platform flow device for microbial (co-) cultivation and microscopic analysis // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – № 5. – P. 1-8.
51. Hirao T., Sato M., Shirahata A., Kamio Y. Covalent linkage of polyamines to peptidoglycan in *Anaerovibrio lipolytica* // J. Bacteriol. – 2000. – Vol. 182(4). – P. 1154-1157.
52. Hoehler T.M., Jorgensen B.B. Microbial life under extreme energy limitation // Nature Reviews Microbiology. – 2013. – Vol. 11(2). – P. 83–94.
53. Hu P., Tom L., Singh A., Thomas B.C., Baker B.J., Piceno Y.M., Andersen G.L., Banfield J.F. Genome-resolved metagenomic analysis reveals roles for candidate

- phyla and other microbial community members in biogeochemical transformations in oil reservoirs // *mBio*. – 2016. – Vol. 7(1). – Article e01669-15. – doi.org/10.1128/mBio.01669-15
54. Hugenholtz P., Goebel B.M., Pace N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity // *J. Bacteriol.* – 1998. – Vol. 180(18). – P. 4765–4774.
55. Ikkert O.P., Gerasimchuk A.L., Bukhtiyarova P.A., Tuovinen O.H., Karnachuk O.V. Characterization of precipitates formed by H<sub>2</sub>S-producing, Cu-resistant Firmicute isolates of *Tissierella* from human gut and *Desulfosporosinus* from mine waste // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2013. – V. 103(6). – P. 1221-1234.
56. Imachi H, Nobu MK, Nakahara N, Morono Y., Ogawara M., Takaki Y., Takano Y., Uematsu K., Ikuta T., Ito M., Matsui Y., Miyazaki M., Murata K., Saito Y., Sakai S., Song C., Tasumi E., Yamanaka Y., Yamaguchi T., Kamagata Y., Tamaki H., Takai K. Isolation of an archaeon at the prokaryote-eukaryote interface // *Nature*. – 2020. – Vol. 577 (7791). – P. 519-525.
57. Ingham C.J., Sprengels A., Bomer J., Molenaar D., Van den Berg A., Johan E. T., Van Hylckama V., De Vos W.M. The micro-Petri dish, a million-well growth chip for the culture and high-throughput screening of microorganisms // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2007. – Vol. 104. – № 46. – P. 18217-18222.
58. Ino K., Hermsdorf A.W, Konno U., Kouduka M., Yanagawa K., Kato S., et al. Ecological and genomic profiling of anaerobic methane-oxidizing archaea in a deep granitic environment // *ISME J.* – 2018. – Vol. 12. – P. 31-47.
59. Itävaara M., Nyysönen M., Kapanen A., Nousiainen A., Ahonen L., Kukkonen I. Characterization of bacterial diversity to a depth of 1500 m in the Outokumpu deep borehole, Fennoscandian Shield // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2011. – Vol. 77. – № 2. – P. 295-309.

60. Jørgensen B.B., D'Hondt S. A starving majority deep beneath the seafloor // *Science*. – 2006. – Vol. 314. – Iss. 5801. – P. 932-34. – DOI:10.1126/science.1133796 53.
61. Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Banks D., Pimenov N.V., Frank Y., Karnachuk O.V., Ravin N.V. A metagenomic window into the 2-km-deep terrestrial subsurface aquifer revealed multiple pathways of organic matter decomposition // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2018. – Vol. 94. – Iss. 10. – Article fiy152. – DOI:10.1093/femsec/fiy152.
62. Kaksonen A.H., Spring S., Schumann P., Kroppenstedt R.M., Puhakka J.A. *Desulfotomaculum thermosubterraneum* sp. nov., a thermophilic sulfate-reducer isolated from an underground mine located in a geothermally active area // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 56. – Iss. 11. – P. 2603-2608.
63. Karnachuk O.V., Kurochkina S.Y., Tuovinen O.H. Growth of sulfate-reducing bacteria with solid-phase electron acceptors // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 58. – P. 482-486. – DOI:10.1007/s00253-001-0914-3.
64. Katayama T., Nobu M.K., Kusada H., Meng X., Hosogi N., Uematsu K., Yoshioka H., Kamagata Y., Tamaki H. Isolation of a member of the candidate phylum 'Atribacteria' reveals a unique cell membrane structure // *Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 11(1). – P. 1-9.
65. Keller M., Zengler K. Tapping into microbial diversity // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2004. – Vol. 2. – P. 141-150. – DOI:10.1038/nrmicro819
66. Kieft T. Sampling the deep sub-surface using drilling and coring techniques // *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology.* – Springer. – 2010. – P. 3427–3441.
67. Kimura H., Sugihara M., Yamamoto H., Patel B. K., Kato K., Hanada S. Microbial community in a geothermal aquifer associated with the subsurface of

- the Great Artesian Basin, Australia // *Extremophiles*. – 2005. – Vol. 9. – Iss. 5. – P. 407-414. – DOI:10.1007/s00792-005-0454-3.
68. Kontorovich A.E., Yan P.A., Zamirailova A.G., Kostyreva E.A., Eder V.G. Classification of rocks of the Bazhenov Formation // *Russ. Geol. Geophys.* – 2016. – Vol. 57. – Iss. 11. – P. 1606-12. – DOI:10.1016/j.rgg.2016.10.006 46.
69. Köpke B., Wilms R., Engelen B., Cypionka H., Sass H. Microbial diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – Vol. 71(12). – P. 7819-7830.
70. Labonté J.M., Field E. K., Lau M., Chivian D., Heerden E.V., Wommack K. E., Kieft T.L., Onstott T.C., Stepanauskas R. Single cell genomics indicates horizontal gene transfer and viral infections in a deep subsurface Firmicutes population // *Front. Microbiol.* – 2015. – Vol. 6. – Article 349. – DOI: 10.3389/fmicb.2015.00349.
71. Lagier J.-C., Armougom F., Million M., Hugon P., Pagnier I., Robert C., Bittar F., Fournous G., Gimenez G., Maraninchi M., Trape J.-F., Koonin E.V., La Scola B., Raoult D. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2012. – Vol. 18. – № 12. – P. 1185-1193. – DOI:10.1111/1469-0691.12023.
72. Lau M.C.Y., Kieft T.L., Kuloyo O., Linage-Alvarez B., van Heerden E., Lindsay M. R., Magnabosco C., Wang W., Wiggins J.B., Guo L., Perlman D.H., Kyin S., Shwe H.H., R.L. Harris, Oh Y., Yi M.J., Purtschert R., Slater G.F., Ono S., Wei S., Li L, Lollar B.S., Onstott T.C. An oligotrophic deep-subsurface community dependent on syntrophy is dominated by sulfur-driven autotrophic denitrifiers // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2016. – Vol. 113. – Article E7927–E7936. – DOI: 10.1073/pnas.1612244113.

73. Leadbetter J.R. Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 6(3). – P. 274-281.
74. Lewin A., Johansen J., Wentzel A., Kotlar H.K., Drabløs F., Valla S. The microbial communities in two apparently physically separated deep subsurface oil reservoirs show extensive DNA sequence similarities // *Environ Microbiol.* – 2014. – Vol. 16(2). – P. 545–558.
75. Lewis K., Epstein S., D'Onofrio A., Ling L.L. Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites // *The Journal of Antibiotics.* – 2010. – Vol. 63. – P. 468–476. –DOI:10.1038/ja.2010.87.
76. Lin L-H., Wang P-L., Rumble D., Lippmann-Pipke J., Boice E., Pratt L.M., Lollar B. S., Brodie E.L., Hazen T.C., Andersen G.L., DeSantis T.Z., Moser D.P., Kershaw D., Onstott T.C. Long-term sustainability of a high-energy, low-diversity crustal biome // *Science.* –2006. – Vol. 314. – Article 479. – DOI:10.1126/science.1127376.
77. Liu Y., Karnauchow T.M., Jarrell K.F., Balkwill D.L., Drake G.R., Ringelberg D., Clarno R., Boone D.R. Description of two new thermophilic *Desulfotomaculum* spp., *Desulfotomaculum putei* sp. nov., from a deep terrestrial subsurface, and *Desulfotomaculum luciae* sp. nov., from a hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 1997. – Vol. 47. – Iss. 3. – P. 615-621.
78. Lloyd K.G., Steen A.D., Ladau J., Yin J., Crosby L. Phylogenetically novel uncultured microbial cells dominate earth microbiomes // *mSystems.* – 2018. – Vol. 3. – № 5. – P. 1-12.
79. Locey K.J., Lennon J.T. Scaling laws predict global microbial diversity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2016. – Vol. 113. – № 21. – P. 5970-5975.

80. Lomstein B., Langerhuus A.T., D'Hondt S., Jørgensen B.B., Spivack A.J. Endospore abundance, microbial growth and necromass turnover in deep sub-seafloor sediment // *Nature*. – 2012. – Vol. 484. – P. 101-104.
81. Love C.A., Patel B.K.C., Nichols P.D., Stackebrandt E. *Desulfotomaculum australicum* sp. nov., a thermophilic sulfatereducing bacterium isolated from the great artesian basin of Australia // *Syst. Appl. Microbiol.* – 1993. – Vol. 16. – Iss. 2. – P. 244-251.
82. Ma L., Kima J., Hatzenpichler R., Karymova M.A., Hubert N., Hanan I. M., Chang E.B, and Ismagilov R.F. Gene-targeted microfluidic cultivation validated by isolation of a gut bacterium listed in Human Microbiome Project's Most Wanted taxa // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2014. – Vol. 111. – № 27. – P. 9768–9773.
83. Magnabosco C., Tekere M., Lau M.C., Linage B., Kuloyo O., Erasmus M., Cason E., van Heerden E., Borgonie G., Kieft T.L. Comparisons of the composition and biogeographic distribution of the bacterial communities occupying South African thermal springs with those inhabiting deep subsurface fracture water // *Front. Microbiol.* – 2014. – Vol. 5. – Article 679. – DOI:10.3389/fmicb.2014.00679.
84. McMahon S. and Parnell J. Weighing the deep continental biosphere // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2014. – Vol. 87. – Iss. 1. – P. 113-120.
85. Michael A.J. Polyamine function in archaea and bacteria // *J. Biol. Chem.* – 2018. – Vol. 293(48). – P. 18693-18701.
86. Momper L., Jungbluth S.P., Lee M.D., Amend J.P. Energy and carbon metabolisms in a deep terrestrial subsurface fluid microbial community // *ISME J.* – 2017. – Vol. 11(10). – P. 2319-2333.
87. Moser D.P., Gihring T.M., Brockman F.J., Fredrickson J.K., Balkwill D.L., Dollhopf M.E., Sherwood Lollar B., Pratt L.M., Boice E., Southam G., Wanger G., Baker B.J., Pfiffner S.M., Lin L., Onstott T.C. *Desulfotomaculum* and

- Methanobacterium* spp. dominate a 4- to 5-kilometer-deep fault // Appl Environ Microbiol. – 2005. – Vol. 71(12). – P. 8773-8783.
88. Muller E.E.L., Glaab E., May P., Vlassis N., Wilmes P. Condensing the omics fog of microbial communities // Trends Microbiol. – 2013. – Vol. 21. – Iss. 7. – P. 325-333.
89. Murakami Y., Fujita Y., Naganuma T., Iwatsuki T. Abundance and viability of the groundwater microbial communities from a borehole in the Tono uranium deposit area, central Japan // Microbes Environ. – 2002. – Vol. 17. – P.63-74.
90. Muyzer G., Stams A.J.M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria // Nat. Rev. Microbiol. – 2008. – Vol. 6. – P. 441-454.
91. Nilsen R.K., Torsvik N., Lien T. *Desulfotomaculum thermocisternum* sp. nov., a sulfate reducer isolated from a hot North Sea oil reservoir // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1996. – Vol. 46. – Iss. 2. – P. 397–402.
92. Novikov D.A., Shvartsev S.L. Hydrogeological conditions of the Pre-Enisei petroleum subprovince // Russ. Geol. Geophys. – 2009. – Vol. 50. – P. 873-83. – DOI:10.1016/j.rgg.2009.09.005.
93. Nyssönen M., Hultman J., Ahonen L., Kukkonen I., Paulin L., Laine P., Itävaara M., Auvinen P. Taxonomically and functionally diverse microbial communities in deep crystalline rocks of the Fennoscandian shield // ISME J. – 2014. – Vol. 8(1). – P. 126-138.
94. O’Sullivan L.A., Roussel E.G., Weightman A.J., Webster G., Hubert C.R.J., Bell E., Head I., Sass H., Parkes R.J. Survival of *Desulfotomaculum* spores from estuarine sediments after serial autoclaving and high-temperature exposure // ISME J. – 2015. – Vol. 9(4). – P. 33-922. – DOI:10.1038/ismej.2014.190.
95. Onstott T., Moser D.P., Pfiffner S.M., Fredrickson J.K., Brockman F.J., Phelps T., White D., Peacock A., Balkwill D., Hoover R. Indigenous and contaminant

- microbes in ultradeep mines // Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 5(11). – P. 1168–1191.
96. Orcutt B.N., Sylvan J.B., Knab N.J., Edwards K.J. Microbial Ecology of the Dark Ocean above, at, and below the Seafloor // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2011. – Vol. 75 (2). – P. 361-422.
97. Orphan V.J., Goffredi S.K., Delong E.F., Boles J.R. Geochemical influence on diversity and microbial processes in high temperature oil reservoirs // Geomicrobiol J. – 2003. – Vol. 20. – Iss. 4. – P. 295– 311.
98. Osorio H., Mangold S., Denis Y., Ñancucheo I., Esparza M., Johnson D.B., Bonnefoy V., Dopson M., Holmes D.S. Anaerobic sulfur metabolism coupled to dissimilatory iron reduction in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* // Appl. Environ. Microbiol. – 2013. – Vol. 79. – № 7. – P. 2172 – 2181.
99. Overmann J. The phototrophic consortium "*Chlorochromatium aggregatum*" - a model for bacterial heterologous multicellularity // Adv. Exp. Med. Biol. – 2010. – Vol. 675. – P. 15-29.
100. Park J., Kerner A., Burns M. A., Lin X.N. Microdroplet-Enabled Highly Parallel Co-Cultivation of Microbial Communities // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6. – № 2. – P. 1-7.
101. Parkes R.J., Cragg B.A., Wellsbury P. Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review // Hydrogeology Journal. – 2000. – Vol. 8. – P.11-28.
102. Pedersen K. Metabolic activity of subterranean microbial communities in deep granitic groundwater supplemented with methane and H<sub>2</sub> // ISME J. – 2013. – Vol. 7(4). – P. 839-849.
103. Pedersen K. Subterranean microorganisms and radioactive waste disposal in Sweden // Eng Geol. – 1999. – Vol. 52. – Iss. 3-4. – P. 163-176.

104. Peters J.W., Schut G.J., Boyd E.S., Mulder D.W., Shepard E.M., Broderick J.B., King P.W., Adams M.W. [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2015. – Vol. 1853. – Iss. 6. – P. 1350-1369.
105. Pfeifer F. Distribution, formation and regulation of gas vesicles // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2012. – Vol. 10(10). – P.15-705. DOI:10.1038/nrmicro2834.
106. Phelps T.J., Murphy E.M., Pfiffner S.M., White D.C. Comparison between geochemical and biological estimates of subsurface microbial activities // *Microb. Ecol.* – 1994. – Vol. 28. – P. 335-49. – DOI:10.1007/BF00662027.
107. Plugge C.M., Zhang W., Scholten J.C. M., Stams A.J. M. Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria // *Front. Microbiol.* – 2011. – Vol. 2. – Article 81.
108. Podosokorskaya O.A., Kadnikov V.V., Gavrilov S.N., Mardanov A.V., Merkel A.Y., Karnachuk O.V., Ravin N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. Characterization of *Melioribacter roseus* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic thermophilic cellulolytic bacterium from the class Ignavibacteria, and a proposal of a novel bacterial phylum Ignavibacteriae // *Environ. Microbiol.* – 2013. – V. 15(6). – P. 759-771.
109. Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P. FastTree: computing large minimum-evolution trees with profiles instead of a distance matrix // *Mol. Biol. Evol.* – 2009. – Vol. 26(7). – P. 1641-1650.
110. Probst A.J., Birarda G., Holman H-YN., DeSantis T.Z., Wanner G., Andersen G.L., Perras A.K., Meck S., Völkel J., Bechtel H.A. Coupling genetic and chemical microbiome profiling reveals heterogeneity of archaeome and bacteriome in subsurface biofilms that are dominated by the same archaeal species // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9(6). – Article e99801. – DOI:10.1371/journal.pone.0099801.

111. Purkamo L., Bomberg M., Nyysönen M., Kukkonen I., Ahonen L., Itävaara M. Heterotrophic communities supplied by ancient organic carbon predominate in deep fennoscandian bedrock fluids // *Microb. Ecol.* – 2015. – Vol. 69(2). – P. 319-332.
112. Rabus R., Hansen T.A., Widdel F. *Dissimilatory Sulfate – and Sulfur–Reducing Prokaryotes* // Springer – Verlag Berlin Heidelberg – 2013.
113. Rabus R., Venceslau S.S., Wöhlbrand L., Voordouw G., Wall J.D., Pereira I.A. A post-genomic view of the ecophysiology, catabolism and biotechnology relevance of sulfate-reducing prokaryotes // *Advances in Microbial Physiology.* – 2015. – Vol. 66. – P. 55-321.
114. Rajala P., Bomberg M., Kietäväinen R., Kukkonen I., Ahonen L., Nyysönen M., Itävaara M. Rapid reactivation of deep subsurface microbes in the presence of C-1 compounds // *Microorganisms.* – 2015. – Vol. 3(1). – P. 17-33.
115. Rappe M.S. and. Giovannoni S.J The uncultured microbial majority // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2003. – Vol. 57. – P. 369-94.
116. Rappé M.S., Connon S.A., Vergin K.L., Giovannoni S.J. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade // *Nature.* – 2002. – Vol. 418. – P630–633.
117. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // *J. Cell Biology.* – 1963. – № 17. – P. 208-212.
118. Rousk J., Bengtson P. Microbial regulation of global biogeochemical cycles // *Front. in Microbiology.* – 2014. – Vol. 5. – Article 103.
119. Sahl J.W., Schmidt R., Swanner E.D., Mandernack K.W., Templeton A.S., Kieft T.L., Smith R.L., Sanford W.E., Callaghan R.L., Mitton J.B. Subsurface microbial diversity in deep-granitic-fracture water in Colorado // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – Vol. 74(1). – P. 143–152.

120. Sánchez-Andrea I., Stams A.M., Hedrich S., Nancucheo I., Johnson D.B. *Desulfosporosinus acididurans* sp. nov.: an acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acidic sediments // *Extremophiles*. – 2015. – Vol. 19(1). – P. 39-47.
121. Schloss P.D., Girard R.A., Martin T., Edwards J., Cameron J., Thrash J.C. Status of the Archaeal and Bacterial Census: an Update // *ASM Journals*. – 2016. – Vol. 7. – № 3. – P. 1-10.
122. Sekiguchi Y., Muramatsu M., Imachi H., Narihiro T., Ohashi A., Harada H., Hanada S., Kamagata Y. *Thermodesulfovibrio aggregans* sp. nov. and *Thermodesulfovibrio thiophilus* sp. nov., anaerobic, thermophilic, sulfate-reducing bacteria isolated from thermophilic methanogenic sludge, and emended description of the genus *Thermodesulfovibrio* // *Int. J. System. Evol. Microbiol.* – 2008. – Vol. 58. – Iss. 11. – P. 2541-2548. – DOI: 10.1099/ij.s.0.2008/000893-0.
123. Smith D.J., Timonen H.J., Jaffe D.A., Griffin D.W., Birmele M.N., Perry K.D., Ward P.D., Roberts M.S. Intercontinental dispersal of bacteria and archaea by transpacific winds // *Appl Environ Microbiol.* – 2013. – Vol. 79(4). – P. 1134-9. – DOI:10.1128/AEM.03029-12.
124. Sonne-Hansen J., Ahring B. K. *Thermodesulfobacterium hveragerdense* sp.nov., and *Thermodesulfovibrio islandicus* sp. nov., two thermophilic sulfate-reducing bacteria isolated from a Icelandic hot spring // *Syst. Appl. Microbiol.* – 1999. – Vol. 22(4). – P. 559–564. – DOI:10.1016/S0723-2020(99)80009-5.
125. Staley J.T., Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1985. – Vol. 39. – P. 321-346.
126. Stevens T.O., McKinley J.P. Lithoautotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers // *Science*. – 1995. – Vol. 270. – N 5235. – P. 450-455.
127. Suzuki S., Si I., Wu A., Cheung A., Tenney A., Wanger G., Kuenen J.G., Nealson K.H. Microbial diversity in The Cedars, an ultrabasic, ultrareducing, and

- low salinity serpentinizing ecosystem // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2013. – Vol. 110(38). – P. 15336-15341.
128. Takai K., Komatsu T., Inagaki F., Horikoshi K. Distribution of archaea in a black smoker chimney structure // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67(8). – P. 3618-3629.
129. Teske A.P. The deep subsurface biosphere is alive and well // Trends in Microbiol. – 2005. – Vol. 13(9). – P. 402-406.
130. Tyson G.W., Banfield J.F. Rapidly evolving CRISPRs implicated in acquired resistance of microorganisms to viruses // Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 10. – P. 200-7. – DOI:10.1111/j.1462-2920.2007.01444.x.
131. Undeen A.H., Vavra J.I. Research methods for entomopathogenic Protozoa. In: Lacey LA ed. Manual of techniques in insect pathology. San Diego, Academic Press. – 1997. – P. 117-151.
132. Wade P.A., Pruss D., Wolffe A.P. Histone acetylation: chromatin in action // Trends Biochem. Sci. – 1997. – Vol. 22. – № 4. – P.128–132. – DOI: 10.1016/s0968-0004(97)01016-5.
133. Watanabe M., Kojima H., Fukui M. Review of *Desulfotomaculum* species and proposal of the genera *Desulfallas* gen. nov., *Desulfofundulus* gen. nov., *Desulfofarcimen* gen. nov. and *Desulfohalotomaculum* gen. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2018. – Vol. 68(9). – P. 2891-2899.
134. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. – 1991. – V. 173(2). – P. 697-703.
135. Widdel F., Pfennig N. Sporulation and further nutritional characteristics of *Desulfotomaculum acetoxidans* // Arch. Microbiol. – 1981. – Vol. 129. – P. 2-401. – DOI:10.1007/BF00406471.

136. Widdel F.F., Bak R. Gram negative mesophilic sulfate reducing bacteria // *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications* / Eds. Balows A. et al. Berlin: Springer. – 1992. – P. 3352-3378.
137. Winterberg H. Zur Methodik der Bakterienzählung // *Zeitschr f Hyg.* – 1898. – Vol. 29. – P. 75–93. – DOI:10.1007/BF02217377.
138. Woese C.R. Bacterial evolution // *Microbiol. Rev.* – 1987. – Vol. 51. – № 2. – P.221-71.
139. Wu X., Holmfeldt K., Hubalek V., Lundin D., Åström M., Bertilsson S., Dopson M. Microbial metagenomes from three aquifers in the Fennoscandian shield terrestrial deep biosphere reveal metabolic partitioning among populations // *ISME J.* – 2016. – Vol. 10(5). – P. 1192-1203.
140. Xu Huai-Shu, Roberts N., Singleton F.L., Attwell R.W., Grimes D.J., Colwell R.R. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment // *Microbial Ecology.* – 1982. – Vol. 8(4). – P. 313-323.
141. Zobell C.E. Studies on the bacterial flora of marine bottom sediments // *J. Sediment. Res.* – 1938. – Vol. 8. – P. 10-18.
142. ZoBell C.E., Anderson D.Q. Vertical distribution of bacteria in marine sediments // *AAPG Bull.* – 1936. – Vol. 20. – P. 258-269.
143. Карначук О.В., Герасимчук А.Л., Бэнкс Д., Френгстад Б., Стыкон Г.А., Тихонова З.Л., Каксонен А.Х., Пухакка Я.А., Яненко А.С., Пименов Н.В. Бактерии цикла серы в осадках хвостохранилища добычи золота в Кузбассе // *Микробиология.* – 2009. – V. 78(4) – С. 535-544.
144. Карначук О.В., Пименов Н.В., Юсупов С.К., Франк Ю.А., Пухакка Я.А., Иванов М.В. Распределение, разнообразие и активность

- сульфатредуцирующих бактерий в водной толще озера Гёк-Гёль, Азербайджан // Микробиология. – 2006. – Vol. 75. – № 1. – С.101-109.
145. Карупу В.Я. Электронная микроскопия. – Киев: «Вища школа». – 1984. – С. 208.
146. Назина Т.Н., Иванова А.Е., Канчавели Л.П., Розанова Е.П. Новая спорообразующая термофильная метилотрофная сульфатвосстанавливающая бактерия *Desulfotomaculum kuznetsovii* sp. nov. // Микробиология. – 1988. – Т. 57. – С. 823-827.
147. Назина Т.Н., Розанова Е.П., Белякова Е.В., Лысенко А.М., Полтараус А.Б., Турова Т.П., Осипов Г.А., Беляев С.С. Описание “*Desulfotomaculum nigrificans* subsp. *salinus*” в качестве нового вида *Desulfotomaculum salinum* sp. nov. // Микробиология. – 2005. – Т. 74. – С. 654–662.
148. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих Под. ред. Ю.В. Полякова. // М: «Мир». – 1975. – С. 326.