

## ВЫДЕЛЕНИЕ НОВЫХ ТЕРМОФИЛЬНЫХ СУЛЬФИДОГЕНОВ ИЗ МИКРОБНЫХ ОБРАСТАНИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МЕСТОМ ИЗЛИВА ПОДЗЕМНЫХ ВОД В ТУНКИНСКОЙ ДОЛИНЕ

© 2019 г. А. П. Лукина<sup>а</sup>, Ю. А. Франк<sup>а, \*</sup>, Д. А. Ивасенко<sup>а</sup>, Л. Б. Глухова<sup>а</sup>,  
Э. В. Данилова<sup>б</sup>, М. Р. Авакян<sup>а</sup>, О. В. Карначук<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Лаборатория биохимии и молекулярной биологии, Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия

<sup>б</sup>Лаборатория микробиологии, Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, 670047 Россия

\*e-mail: yulia.a.frank@gmail.com

Поступила в редакцию 11.03.2019 г.

После доработки 29.04.2019 г.

Принята к публикации 29.05.2019 г.

DOI: 10.1134/S0026365619050100

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 году была проведена ревизия *Desulfotomaculum*, в результате которой выделены четыре новых рода *Desulfallas*, *Desulfofundulus*, *Desulfofarcimen* и *Desulfohalotomaculum* (Watanabe et al., 2018).

Самоизливающиеся нефтепоисковые скважины дают хорошую возможность получить доступ к воде из термальных горизонтов, расположенных на глубине нескольких километров. Кроме того, артезианская вода, поступающая под давлением из скважины, исключает возможность загрязнения поверхностными микроорганизмами. К настоящему времени основным источником информации о микроорганизмах, населяющих подземные воды, являются молекулярные методы, основанные на высокопроизводительном секвенировании. Культивирование многих организмов, чье присутствие зафиксировано молекулярными подписями, не приводило к успеху (Labonté et al., 2015). В наших попытках усовершенствовать подходы к культивированию представителей подземной биосферы мы обратили внимание на микробные обрастания, которые часто формируются в местах разлива подземных скважин. Некоторые термофилы, поступающие из глубинных горизонтов, могут накапливаться в микробных матах, где сохраняется повышенная температура и появляется доступ к органическим соединениям, образуемым фототрофами. Хорошим примером служит получение чистой культу-

ры *Melioribacter roseus*, выделенного из микробного обрастания в месте разлива термальной нефтепоисковой скважины, что в конечном итоге привело к описанию нового филума (Podosokorskaya et al., 2013).

Целью настоящего исследования было выделение термофильных сульфидогенных микроорганизмов из микробных матов, образующихся на разливе термального источника в поселке Жемчуг Тункинского района республики Бурятия.

Нефтепоисковая скважина 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. Термальная вода содержит сероводород, являющийся бальнеологическим компонентом, поэтому культивирование было направлено на выделение сульфатвосстанавливающих микроорганизмов.

Физико-химические параметры термальной воды, pH, температуру и окислительно-восстановительный потенциал, измеряли на разливе скважины pH-метром HI83141 (“Hanna Instruments”). Концентрацию сероводорода измеряли из проб, зафиксированных ацетатом цинка, спектрофотометрически, а элементный состав воды – масс-спектрометрией с индуктивно-связанной плазмой как описано ранее (Karnachuk et al., 2008, Mardanov et al., 2016). Для получения накопительных культур сульфидогенов была использована пресноводная среда Видделя-Бака (WB) с добавлением растворов микроэлементов, витаминов, смеси селената и вольфрамата, и восстановленная раствором сульфида натрия (Widdel, Bak, 1992). В качестве доноров электронов и источников углерода использовали 7.5 мМ формиат, 9 мМ ацетат, 7.3 мМ лактат, 13.5 мМ пропионат, 7 мМ изобутират, а также пептон, желатин (каждый в кон-

**Таблица 1.** Физико-химические параметры воды скважины Г-1

Параметры	Значения
pH	6.75
Температура, °C	54.8
<i>Eh</i> , mV	-238
Содержание в воде, мг/л:	
Na	985
Mg	184
Ca	168
Si	100
K	39.5
Sr	6.17
B	4.70
Li	2.98
Fe	0.87
Ba	0.22
Se	0.20
P	0.099
Rb	0.095
Mn	0.087
Sc	0.037
Al	0.024
Ge	0.019
Zn	0.012
Cr	0.009
As	0.004
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	<10
H <sub>2</sub> S	0.93 ± 0.37

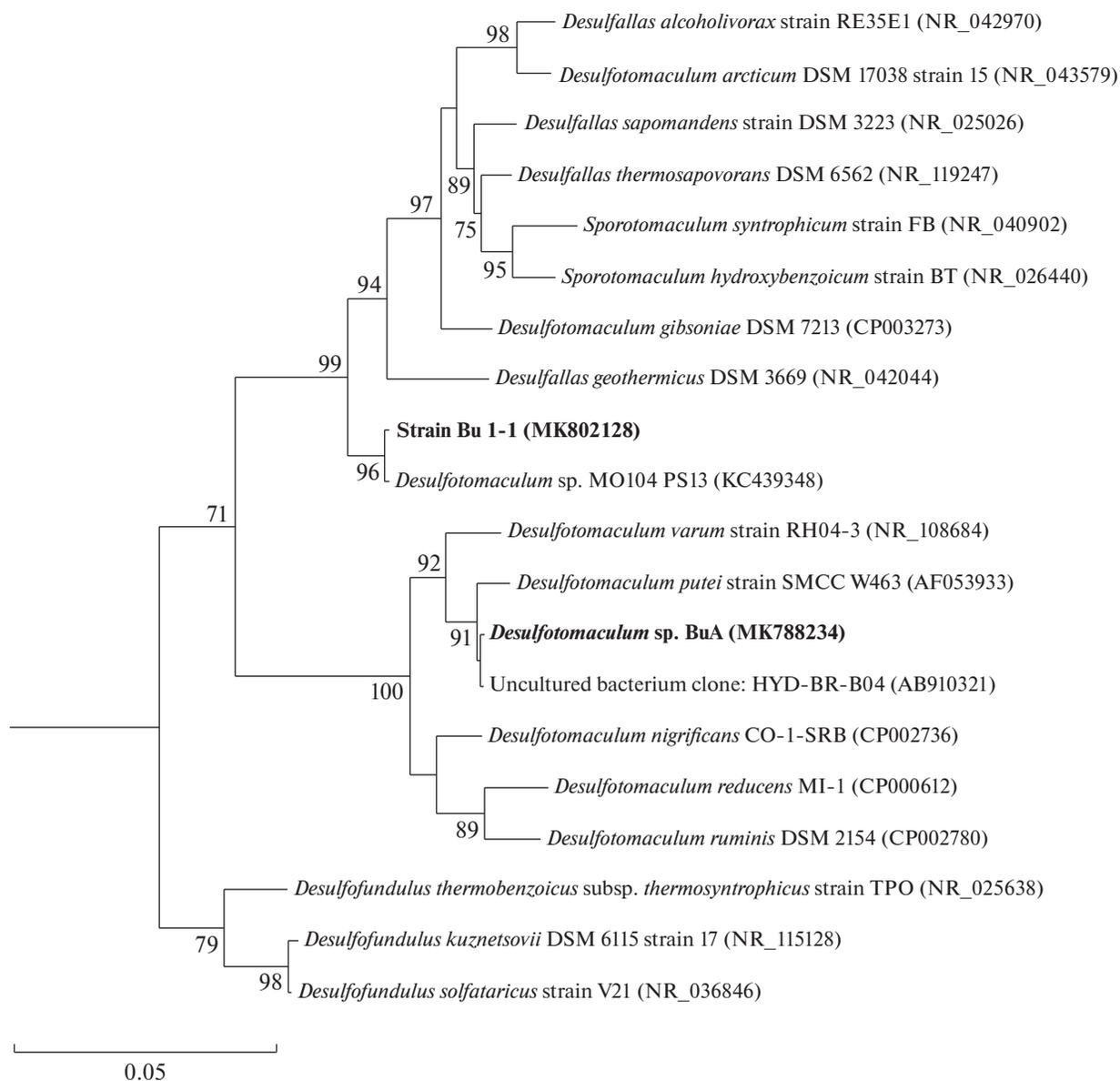
центрации 1%) и целлюлозу (100 мг на флакон объемом 12 мл). Во флаконы со средой помещали небольшое количество матов, после чего инкубировали при температуре 50°C. Филогенетическое положение изолятов определяли по последовательности гена 16S рРНК после амплификации с праймерами 27F-1492R. Выделение ДНК и условия амплификации описаны ранее (Frank et al., 2016). Номера доступа гена 16S рРНК в GenBank NCBI – MK802128 и MK788234.

В момент отбора проб микробных матов температура воды составляла 54.8°C, pH 6.75, низкий окислительно-восстановительный потенциал, -238 mV, свидетельствовал о восстановленных условиях (табл. 1). Вода имела выраженный запах сероводорода, концентрация которого составляла 0.93 мг/л.

Были получены накопительные культуры, активно продуцирующие сероводород на среде с изобутиратом и ацетатом. Выделение чистых

культур проводили путем последовательных десятикратных разведений. Наблюдение накопительных культур под микроскопом показало присутствие клеток со спорами. Для их выделения культуры выдерживали при температуре 95°C в течение 15 мин. После чего получали отдельные колонии на твердой среде с добавлением изобутирата и ацетата в качестве источников углерода и электронов. Чистоту выделенных культур спорообразующих сульфидогенов подтвердило отсутствие роста на Plate Count Agar и Anaerobic Agar, а также определение последовательности гена 16S рРНК. Изолят, выделенный на среде с изобутиратом, был обозначен как штамм Bu 1-1, 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 (рис. 1). Сходство последовательностей гена 16S рРНК, 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 рРНК 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% (рис. 1). Вероятно, штамм BuA является новым штаммом *D. putei*. Для штамма Bu 1-1 были определены возможные доноры электронов, которые включали: формиаат, ацетат, лактат, пируват, малат, сукцинат, изобутират, пальмитат, фруктозу, сахарозу, глюкозу, этанол, пептон и желатин. Наряду с сульфатом, штамм Bu 1-1 может использовать в качестве акцептора электронов сульфит, тиосульфат, нитрат, арсенат и фумарат. Штамм не восстанавливает элементную серу и нитрит.

К настоящему времени стало очевидно, что подземные термальные системы являются типичным местообитанием спорообразующих сульфат-редуцирующих 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*



**Рис. 1.** Дерево, показывающее филогенетическое положение изолятов Bu 1-1 и BuA на основе анализа последовательностей гена 16S рРНК, определенное методом RAxML (randomized accelerated maximum likelihood, Stamatakis, 2014). Бу-стрепы рассчитаны из 1000 итераций. Масштаб соответствует 5 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов. В качестве удаленного родственника использован *Thermodesulfobivrio yellowstonii* DSM 11347 (на дендрограмме не показан).

(Kaksonen et al., 2006), культура которого была получена из черных обрастаний на стенах глубокой шахты в геотермально активном районе Японии. В 2008 году 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). Интересно отметить, что последовательность гена 16S рРНК штамма Bu 1-1 полностью совпадала с депониро-

ванной в GenBank NCBI KC439348, принадлежащей неопубликованному *Desulfotomaculum* sp. MP104 PS13. Номер штамма предполагает, что бактерия была выделена из той же шахты Мпо-ненг в Южной Африке, в которой был найден далекий родственник группы *Desulfotomaculum*, *Candidatus Desulfurudis audaxviator* (Chivian et al., 2008), выделенный недавно в нашей лаборатории из воды глубоководной скважины в Томской области (Karnachuk et al., 2019). Мы предполагаем, что полученные нами из микробных обрастаний чистые культуры *Desulfallas* sp. Bu 1-1 и *Desulfotomaculum*

сп. ВuA происходят из подземных вод, вскрываемых скважиной Г-1 в Тункинской долине. Однако для подтверждения этого факта необходима дальнейшая проверка присутствия родственных фило типов в воде скважины путем профилирования гена 16S рРНК.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Выделение чистых культур поддержано грантом РНФ № 18-14-00130, а определение филогенетического положения изолятов – грантом РФФИ мол\_а № 18-34-00322.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо материалов исследований с использованием животных в качестве объектов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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.
- 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.
- Aiillo T., Ranchou-Peyruse A., Ollivier B., Magot M. *Desulfotomaculum* spp. and related Gram-positive sulfate-reducing bacteria in deep subsurface environments // Front. Microbiol. 2013. V. 4. 362. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00362>
- Berlendis S., Ranchou-Peyruse M., Fardeau M.-L., Lascourrèges J.-F., Joseph M., Ollivier B., Aiillo 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. V. 66. P. 4329–4338.
- Chivian D., Brodie E.L., Alm E.J., Culley D.E., Dehal P.S., DeSantis T.Z., Gihring T.M., Lapidus A., Lin L.-H., Lowry S.R., Moser D.P., Richardson P.M., Southam G., Wanger G., Pratt L.M., Andersen G.L., Hazen T.C., Brockman F.J., Arkin A.P., Onstott T.C. Environmental genomics revealed single-species ecosystem deep within Earth // Science. 2008. V. 322. P. 275–278.
- 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. V. 57. P. 2259–2261.
- Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R., da Costa M.S., Rooney A.P., Yi H., Xu X.-W., De Meyer S., Trujillo M.E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // Int. J. System. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 461–466.
- 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. V. 54. P. 165–178.
- Frank Y., Banks D., Avakian M., Antsiferov D., Kadychagov P., Karnachuk O. *Firmicutes* is an important component of microbial communities in water-injected and pristine oil reservoirs, Western Siberia, Russia // Geomicrobiol. J. 2016. V. 33. P. 387–400.
- Haouari O., Fardeau M.-L., Cayol J.-L., Casiot C., Elbaz-Poulichet F., Hamdi M., Joseph M., Ollivier B. *Desulfotomaculum hydrothermale* sp. nov., a thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from a terrestrial Tunisian hot spring // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 2529–2535.
- 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. V. 56. P. 2603–2608.
- Karnachuk O.V., Frank Y.A., Lukina A.P., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Ravin N.V. Domestication of previously uncultivated *Candidatus Desulforudis audaxviator* from a deep aquifer in Siberia sheds light on its physiology and evolution // ISME J. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0402-3>
- Karnachuk O.V., Sasaki K., Gerasimchuk A.L., Sukhanova O., Ivashenko D.A., Kaksonen A.H., Puhakka J.A., Tuovinen O.H. Precipitation of Cu-sulfides by copper-tolerant *Desulfovibrio* isolates // Geomicrobiol. J. 2008. V. 25. P. 219–227.
- Labonté J.M., Field E.K., Lau M., Chivian D., Van Heerden E., 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. V. 22. 349. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00349>
- 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. V. 47. P. 615–621.
- Love C.A., Patel B.K.C., Nichols P.D., Stackebrandt E. *Desulfotomaculum australicum* sp. nov., a thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from the great artesian basin of Australia // Syst. Appl. Microbiol. 1993. V. 16. P. 244–251.
- Mardanov A.V., Panova I.A., Beletsky A.V., Avakyan M.R., Kadnikov V.V., Antsiferov D.V., Banks D., Frank Y.A., Pimenov N.V., Ravin N.V., Karnachuk O.V. Genomic insights into a new acidophilic, copper-resistant *Desulfosporosinus* isolate from the oxidized tailings area of an abandoned gold mine // FEMS Microbiol. Ecol. 2016. V. 92 (8). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw111>
- 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. V. 46. P. 397–402.
- 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. P. 1759–771.

*Stamatakis A.* RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies // *Bioinformatics.* 2014. V. 30. P. 1312–1313.

*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. V. 68. P. 2891–2899.

*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.

## Isolation of New Thermophilic Sulfidogens from Microbial Overgrowth Associated with Groundwater Discharge in the Tunkin Valley

A. P. Lukina<sup>1</sup>, Yu. A. Frank<sup>1,\*</sup>, D. A. Ivashenko<sup>1</sup>, L. B. Glukhova<sup>1</sup>, E. V. Danilova<sup>2</sup>,  
M. R. Avakyan<sup>1</sup>, and O. V. Karnachuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

<sup>2</sup>Laboratory of Microbiology, Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, 670047 Russia

\*e-mail: yulia.a.frank@gmail.com

Received March 11, 2019; revised April 29, 2019; accepted May 29, 2019