

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБНЫХ ОБРАСТАНИЙ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ СПОРООБРАЗУЮЩИХ ПРОКАРИОТ ИЗ ПОДЗЕМНОЙ БИОСФЕРЫ

© 2020 г. А. П. Лукина<sup>а</sup>, М. Р. Авакян<sup>а</sup>, Э. В. Данилова<sup>б</sup>, О. В. Карначук<sup>а, \*</sup>

<sup>а</sup>Кафедра физиологии растений и биотехнологии, Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия  
<sup>б</sup>Лаборатория микробиологии, Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, 670047 Россия

\*e-mail: olga.karnachuk@green.tsu.ru

Поступила в редакцию 27.04.2020 г.

После доработки 22.05.2020 г.

Принята к публикации 29.05.2020 г.

Подземная биосфера является богатым источником новых прокариот. В 2019 г. был описан новый род *Thermoanaeroseptrum*, 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, элементарная 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. Целью настоящего исследования было использование микробных обрастаний на изливе глубинной термальной скважины для получения спорообразующих сульфидогенов. Полученная чистая культура *Thermoanaeroseptrum* 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.

**Ключевые слова:** подземная биосфера, культивирование, микробные маты, *Thermoanaeroseptrum*

**DOI:** 10.31857/S0026365620060129

Резервуар углерода в подземных горизонтах по разным оценкам достигает 14–135 Пг (1 Пг = 10<sup>15</sup> г), что составляет 2–19% всей биомассы Земли (McMahon, Parnell, 2014). Наши знания о подземных микроорганизмах в большей части основаны на последовательностях гена 16S рРНК и, в меньшей степени, геномах, собранных из метagenомной информации (metagenome-assembled genomes – MAGs) и полученных из единичных клеток (single amplified genomes – SAGs). Соотношение культивируемых прокариот и числа известных по молекулярным данным минимально для подземных местообитаний (Anantharaman et al., 2018). Причинами этого являются трудности с отбором проб, незагрязненных организмами с поверхности, и сложность культивирования медленно растущих подземных форм (Karnachuk et al., 2019). Своеобразными “окнами” в подземную биосферу являются артезианские скважины, термальные источники, связанные с разломами, и глубокие шахты для добычи минералов. Отбор проб из артезианских скважин, где вода поступает под давлением из глубинных пластов, помогает избежать загрязнения поверхностными организмами.

Подземные водоносные горизонты в большинстве случаев характеризуются олиготрофными условиями, к которым прокариоты приспособляются замедленным метаболизмом. 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

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

Параметры и единицы измерения	Значения
pH	8.06
Температура, °C	39.7
Eh, mV	–386
Содержание в воде, мг/л:	
Na	311
Mg	4.46
Ca	22.4
Si	18.3
K	2.80
Sr	0.31
B	<0.01
Li	0.006
Fe	0.27
Ba	0.063
Se	0.005
P	0.020
Rb	<0.0028
Mn	0.065
Al	0.018
Ge	0.00039
Zn	0.012
Cr	0.011
As	<0.002
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	<10
H <sub>2</sub> S	0.93

первичных накопительных культур. Маты фактически являются природной “ловушкой” для некоторых микроорганизмов.

В 2019 г. из подземных горизонтов Большого Артезианского Бассейна в США была выделена и описана бактерия, *Thermoanaerobacterium fractalcalcis*, 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. fractalcalcis* может использовать криптоические продукты метаболизма других организмов, что и объясняет его незначительное содержание в

сообществе. В геноме *T. fractalcalcis* обнаружена биосульфитредуктаза, 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.

В этом исследовании мы использовали микробные обрастания, формирующиеся на выходе глубинных вод из артезианской термальной скважины в Тункинском районе Республики Бурятия для получения культур сульфатредуцирующих спорообразующих прокариот. Скважина Р-1 была пробурена в 1953–1954 гг. до глубины 834 м. Вода используется для бальнеологических целей. 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. из воды скважины и матов в местах стока термальной воды у основания обсадной трубы. Физико-химические параметры воды, pH, температуру и окислительно-восстановительный потенциал, измеряли рН-метром HI183141 (“Hanna Instruments”). Пробы воды фиксировали ацетатом цинка для определения содержания H<sub>2</sub>S, которое проводили в лаборатории спектрофотометрическим методом с парафенилендиамином (Cline, 1969). Элементный состав воды определяли масс-спектрометрией с индуктивно связанной плазмой как описано ранее (Mardanov et al., 2016). Для получения культур сульфидогенов использовали пресноводную среду Видделя-Бака (WB) с добавлением растворов микроэлементов, витаминов, раствора селената-вольфрамата, сульфида натрия в качестве восстановителя (Widdel, Bak, 1992) и элементного железа (Карначук и соавт., 2006). В качестве доноров электронов использовали 7.5 мМ формиат, 9 мМ ацетат, 7.3 мМ лактат, 13.5 мМ пропионат и 5 мМ глюкозу. В пенициллиновые флаконы со средой помещали небольшое количество матов (на кончике скальпеля), после чего инкубировали флаконы при температуре 50°C. В экспериментах по восстановлению сульфата использовали высокочистый безводный Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (“Sigma-Aldrich”), исключая присутствие недоокисленных соединений серы. Для определения филогенетического положения изолята амплифицировали ген 16S рРНК с праймерами 27F-1492R. Выделение ДНК и условия амплификации были аналогичны описанным ранее (Frank et al., 2016).

Температура воды скважины Р-1 в момент отбора проб составляла 39.7°C, pH 8.06. Вода была сильно восстановлена (Eh = –386 mV) и содержала следы сероводорода (0.93 мг/л) (табл. 1). Активные сульфидогенные накопительные культу-

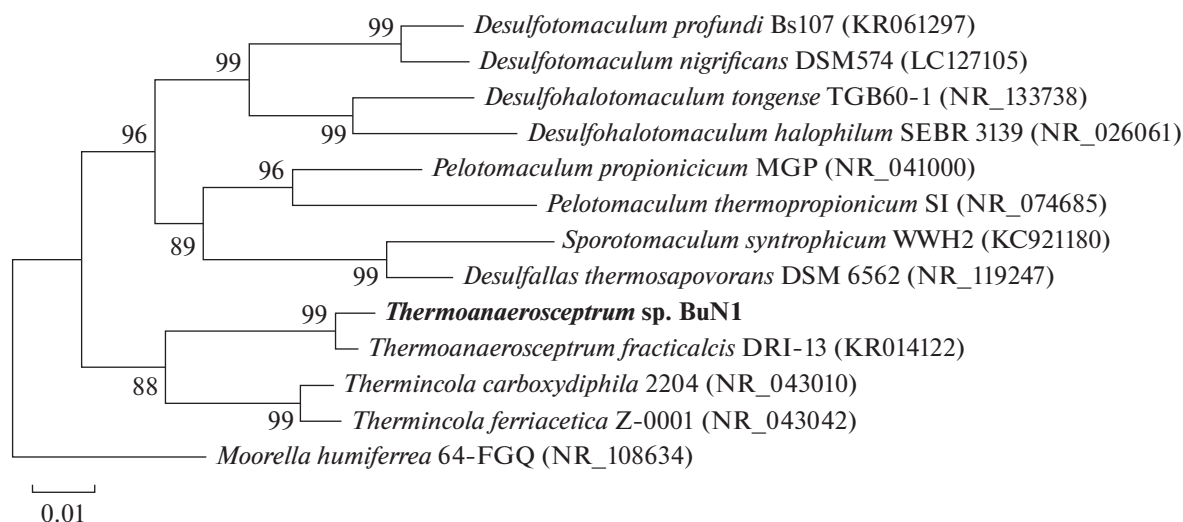


Рис. 1. Дерево, показывающее филогенетическое положение штамма BuN1, построено на основе анализа последовательностей гена 16S рРНК с использованием программы FastTree (Price et al., 2009). Последовательности выровнены в онлайн сервисе SINA ACT (<https://www.arb-silva.de/aligner/>).

ры, содержащие спорообразующие клетки, были получены на среде с глюкозой. Для их выделения в чистую культуру проводили пастеризацию накопительной культуры при температуре 95°C 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.

Анализ последовательности гена 16S рРНК показал, что штамм BuN1 относится к описанному недавно роду *Thermoanaerosceptrum*, представляющему удаленную ветвь внутри фирмикут (рис. 1). Сходство последовательностей гена 16S рРНК с единственным известным видом, *T. fracticalcis*, составляло 97.6%. Однако штамм BuN1 существенно отличался от *T. fracticalcis* прежде всего способностью к восстановлению сульфата. Наряду с сульфатом штамм восстанавливал сульфит и тиосульфат, но не элементарную серу, нитрат или фумарат. *T. fracticalcis* не использует сахара (Hamilton-Brehm et al., 2019), в то время как на глюкозе, фруктозе и сахарозе наблюдали наиболее активный рост BuN1. Неожиданно, максимальный рост штамм демонстрировал на среде с сахарозой, рост на фруктозе и глюкозе был слабее. Скорость роста на сахарозе составляла 0.22 ч<sup>-1</sup>, время удвоения 3.2 ч. При достаточно высокой для анаэроба скорости роста штамм не накапливал значительной биомассы, численность клеток дости-

гала  $2.5 \times 10^5$  клеток/мл в конце экспоненциальной фазы (рис. 2). Содержание сероводорода увеличивалось с ростом клеток и составляло 25 мг/л после 60 ч культивирования. Максимальное содержание сероводорода, зафиксированное при культивировании, составляло 72 мг/л среды.

Штамм BuN1 не использует традиционные для сульфатредукторов доноры электронов — лактат и этанол, но хорошо растет на пирувате. 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 ши-

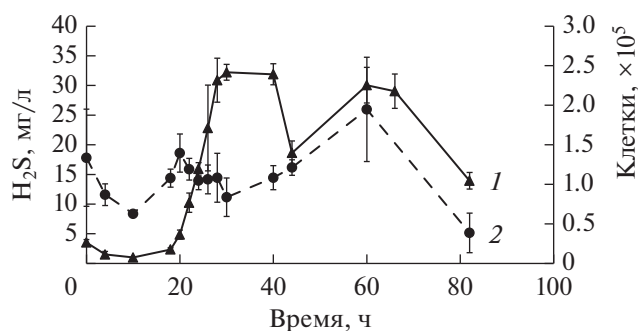


Рис. 2. Рост *Thermoanaerosceptrum* sp. BuN1 на сахарозе, представленный как количество клеток, (1) и изменение концентрации H<sub>2</sub>S (2) в среде. Вертикальные линии показывают стандартное отклонение.

роким диапазоном рН 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 *Thermoanaeroseptum*. 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 *Thermoanaeroseptum* в сообществе подземных горизонтов (Hamilton-Brehm et al., 2019). Происхождение *Thermoanaeroseptum* 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 *Thermoanaeroseptum* sp. BuN1 в совокупности с физиологическими экспериментами позволили понять метаболизм, а также изучить происхождение генов *dsr* в этом роде фирмикут. Возможно, что последовательность нуклеотидов какого-то из белков, связанных с сульфатредукцией, была нарушена у *T. fracticalcis* вставкой в хромосому бактериофага или другого мобильного элемента.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Выделение чистой культуры поддержано грантом РФФИ № 18-34-00322 мол\_а, филогенетический анализ – грантом РНФ № 18-14-00130.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов: А.П. Лукина – выделение и изучение чистой культуры, М.Р. Авакян – филогенетический анализ, Э.В. Данилова – отбор проб мата и воды и их физико-химический анализ, О.В. Карначук – планирование экспериментов, отбор проб, написание статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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. Т. 75. С. 101–109.
- Karnachuk O.V., Pimenov N.V., Yusupov S.K., Frank Y.A., Puhakka Y.A., Ivanov M.V. Distribution, diversity, and activity of sulfate-reducing bacteria in the water column in Gek-Gel Lake, Azerbaijan // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 82–89.
- Anantharaman K., Brown C.T., Hug L.A., Sharon I., Castelle C.J., Probst A.J., Thomas B.C., Singh A., Wilkins M.J., Karaoz U., Brodie E.L., Williams K.H., Hubbard S.S., Banfield J.F. Thousands of microbial genomes shed light on interconnected biogeochemical processes in an aquifer system // Nat. Commun. 2016. V. 7. 13219. <https://doi.org/10.1038/ncomms13219>
- 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. V. 8. P. 837–845.
- Cline J.D. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters // Limnol. Oceanogr. 1969. V. 14. P. 454–458.
- 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. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 461–466.
- 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.
- Hamilton-Brehm S.D., Stewart L.E., Zavarin M., Caldwell M., Lawson P.A., Onstott T.C., Grzymalski J., Neveux I., Lollar B.S., Russell C.E., Moser D.P. *Thermoanaeroseptum fracticalcis* gen. nov. sp. nov., a novel fumarate-fermenting microorganism from a deep fractured carbonate aquifer of the US Great Basin // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 2224.
- 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. V. 13. P. 1947–1959.
- Kjeldsen K.U., Kjellerup B.V., Egli K., Frølund B., Nielsen P.H., Ingvorsen K. Phylogenetic and functional diversity of bacteria in biofilms from metal surfaces of an alkaline district

heating system // FEMS Microbiol. Ecol. 2007. V. 61. P. 384–397.

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. Art. fiw111.

McMahon S., Parnell J. Weighing the deep continental biosphere // FEMS Microbiol. Ecol. 2014. V. 87. P. 113–120.

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. V. 26. P. 1641–1650.

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.

## Application of Microbial Mats for the Isolation of Spore-Forming Prokaryotes from Deep Biosphere

A. P. Lukina<sup>1</sup>, M. R. Avakyan<sup>1</sup>, E. V. Danilova<sup>2</sup>, and O. V. Karnachuk<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Physiology and Biotechnology, 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: olga.karnachuk@green.tsu.ru

Received April 27, 2020; revised May 22, 2020; accepted May 29, 2020

Deep biosphere is an abundant source of novel prokaryotes. A phylogenetically distant lineage of *Firmicutes* was reported in 2019 as a new genus *Thermoanaerosceptrum*. Ecology of this group remains uncertain, since the only known species, *T. fracticalcis*, gains energy from the use of fumarate, and the source of the latter in groundwater is not apparent. The organism is incapable of using any of the oxidized sulfur species (sulfate, sulfite, thiosulfate, or elemental sulfur) as an electron acceptor for respiration, although the proteins required for dissimilatory sulfate reduction are present in the genome. Research on *T. fracticalcis* ecology is complicated by the fact that the organism constitutes a minor component of the microbial community. The present work was aimed at the use of microbial mats formed at the head of a deep thermal borehole to obtain spore-forming sulfidogens. The isolated pure culture, *Thermoanaerosceptrum* sp. BuN1, reduced sulfate and exhibited saccharolytic activity. It could grow within a broad pH range (3.5 to 9). Strain BuN1 was a moderate thermophile growing within the range from 37 to 60°C, with an optimum at 50°C.

**Keywords:** deep biosphere, cultivation, microbial mats, *Thermoanaerosceptrum*