МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 90, № 3, с. 362–366

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

ВЫДЕЛЕНИЕ НОВОГО ХЕМОЛИТОТРОФНОГО СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩЕГО ФИРМИКУТА ИЗ ТЕРМАЛЬНОЙ СКВАЖИНЫ В ТЮМЕНИ

© 2021 г.
И. А. Панова[a], М. А. Григорьев[a], Л. Б. Глухова[a], М. Р. Авакян[a], О. В. Карначук[a, *]

[a] *Кафедра физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики, Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия*

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

Поступила в редакцию 25.11.2020 г.
После доработки 01.12.2020 г.
Принята к публикации 01.12.2020 г.

Водород является ключевым энергетическим субстратом для микробных процессов в подземной биосфере. Известным примером экосистемы, основанной на гидрогенотрофном сульфатредукторе, "*Candidatus* Desulforudis audaxviator", являются фракционные воды глубокой шахты по добыче золота в Южной Африке. В этом исследовании мы сообщаем о культивировании и выделении в чистую культуру нового облигатного хемолитотрофа, восстанавливающего сульфат при росте на водороде или формиате. Филогенетический анализ гена 16S рРНК штамма Tu-874 показал его кластеризацию с "*Candidatus* Desulforudis audaxviator", который является ближайшим культивируемым родственником. Однако низкое сходство последовательностей гена 16S рРНК, составляющее 88.95%, предполагает, что организм представляет новую таксономическую группу надвидового уровня.

Ключевые слова: подземная биосфера, "*Candidatus* Desulforudis audaxviator", сульфатредуцирующие бактерии, культивирование, хемолитотрофы

DOI: 10.31857/S0026365621030125

Подземные местообитания часто характеризуются низким содержанием органического вещества, с чем связано заселение этих биотопов хемолитоавтотрофными прокариотами. Водород является ключевым энергетическим субстратом для микробных процессов в подземной биосфере (Gregory et al., 2019). Наряду с биологическими реакциями источником H_2 могут являться абиотические процессы – радиолиз, серпентинизация, графитизация и катаклаз силикатов. Широко известным примером экосистемы, состоящей из единственного гидрогенотрофного организма "*Candidatus* Desulforudis audaxviator", являются фракционные воды шахты Мпоненг в Южной Африке (Chivian et al., 2008). Авторы исследования показали, что источником формиата и водорода в термальных щелочных водах является радиолиз, в то время, как сульфат представляет преимущественный акцептор электронов. Геном "*Candidatus* Desulforudis audaxviator" содержит все необходимые пути для поддержания независимого биосинтеза, включая фиксацию азота и синтез всех аминокислот. В связи с этими особенностями метаболизма десульфорудиса вслед за расшифровкой генома последовали спекуляции о возможности внеземной жизни, основанной на радиолизе (Atri et al., 2016).

После многочисленных попыток культивирования штамм "*Candidatus* Desulforudis audaxviator" BYF был выделен из глубинных вод Западно-Сибирского артезианского бассейна более чем через десять лет после определения последовательности композитного генома этого вида (Karnachuk et al., 2019). Эксперименты с чистой культурой показали, что, наряду с водородом, штамм BYF использует традиционные для сульфатредукторов органические доноры электронов – лактат, пируват, фумарат, сукцинат, пропионат, бутират, этанол, а также сахара – глюкозу и сахарозу, и не является облигатным хемолитотрофом.

Культивирование автотрофных гидрогенотрофов из подземной биосферы представляет значительные трудности в силу медленных скоростей роста. Другим препятствием при получении культур является низкий титр целевого организма в пробах воды. Концентрирование клеток путем фильтрования является неблагоприятным из-за резкой смены физико-химических условий. Анаэробные организмы могут быть особенно чувствительны к смене окислительно-восстановительного потенциала среды. Ранее мы показали, что микробные об-

Таблица 1. Физико-химические параметры воды скважины 3-р

Параметры и единицы измерения	Значения
pH	7.57
Температура, °C	54.0
Eh, mV	–461
Содержание в воде, мг/л:	
Na	4230
Mg	53.4
Ca	292
Si	5.71
K	19.3
Sr	9.45
B	2.95
Li	0.10
Fe	1.52
Ba	3.66
Se	0.019
P	0.005
Rb	0.017
Mn	0.25
Al	0.001
Ge	0.00048
Zn	0.0051
Cr	0.012
As	0.082
SO_4^{2-}	2.0

растания, формирующиеся на изливе глубинных термальных скважин, могут служить своеобразными фильтрами, концентрирующими организмы глубинной биосферы (Lukina et al., 2019, 2020). “Фильтрация” воды через микробные обрастания позволяет клеткам (или спорам) накапливаться в микрозонах с восстановительными условиями. Использование подобного инокулята может увеличивать эффективность культивирования. В этом исследовании мы сообщаем о выделении нового хемолитотрофного сульфатредуктора с использованием в качестве инокулята микробных обрастаний на устье глубинной нефтедобывающей скважины в Тюмени.

С целью выделения хемолитотрофов подземной биосферы были использованы микробные обрастания на изливе Ярской (3-р) термальной скважины в Тюмени. Скважина 3-р была сдана в эксплуатацию в 1953 году, и ее глубина составляет 2509 м. В настоящее время не известно, с какого горизонта происходит разгрузка артезианской воды. По данным Тюменского геологического управления вода скважины насыщена метаном, содержание которого достигает 63% газовой фазы, в воде также содержится этан, азот и углекислота. Общая минерализация воды составляет 11.8 г/л. В настоящее время скважина разгружается в бассейн, используемый в качества СПА-центра. Пробы воды и микробных обрастаний были отобраны 25 февраля 2019 г. в местах стока термальной воды. Температуру, pH и окислительно-восстановительный потенциал измеряли pH-метром HI183141 (“Hanna Instruments”). Элементный состав воды определяли масс-спектрометрией с индуктивно связанной плазмой, как описано ранее (Mardanov et al., 2016). Для культивирования использовали модифицированную (Карначук и соавт., 2006) среду Видделя–Бака (Widdel, Bak, 1992) с водородом или формиатом в качестве единственного донора электронов. В экспериментах с чистой культурой использовали следующие доноры электронов: 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 55°C в анаэробных условиях. Для определения филогенетического положения изолята амплифицировали ген 16S рРНК с праймерами 27F-1492R. Выделение ДНК и условия амплификации проводили методами, описанными ранее (Frank et al., 2016).

Температура термальной артезианской воды скважины 3-р в момент отбора проб составляла 38.6°C, pH был нейтральным, 7.75 (табл. 1). Окислительно-восстановительный потенциал среды (–461 мВ) свидетельствовал о крайне восстановленных условиях, хотя сероводород, обычно присутствующий в восстановленных подземных водах, в воде скважины не обнаружили. Минерализация воды хлоридно-натриевого типа, содержание сульфата было близко к нулю. После инкубации кусочков микробных обрастаний в течение 1 мес. при температуре 55°C были получены накопительные сульфидогенные культуры, содержащие спорообразующие палочковидные клетки. Чистая культура была получена путем прогрева культуры при температуре 90°C в течение 30 мин и последующими десятикратными разведениями. Выделенная морфологически однородная культура суль-

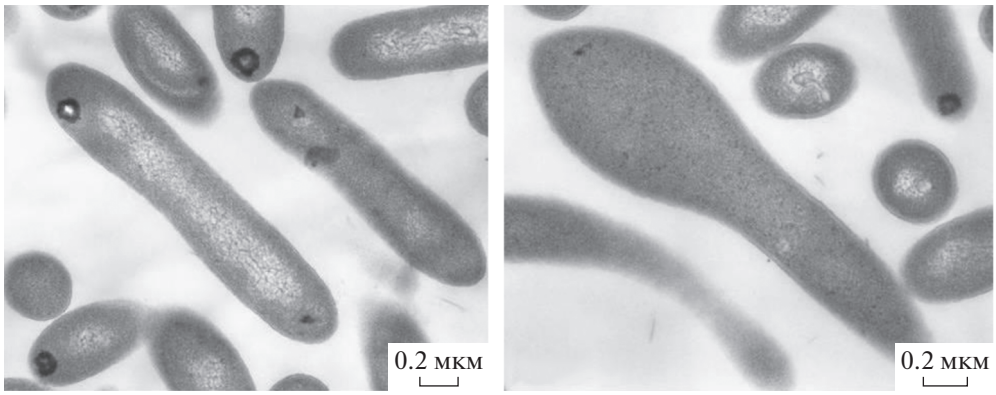

Рис. 1. Трансмиссионные электронные микрофотографии ультратонких срезов клеток штамма Tu-874 с электронно-плотными включениями.

фидогенов была обозначена как штамм Tu-874 и представляла спорообразующие палочки (рис. 1). Анализ последовательности гена 16S рРНК показал, что штамм Tu-874 филогенетически удален от известных культивируемых представителей семейства *Peptococcaceae* и его ближайшим родственником является "*Candidatus* Desulforudis audaxviator" со сходством последовательностей гена 16S рРНК 88.95% (рис. 2). Все ближайшие некультивируемые родственники штамма Tu-874 были обнаружены в подземных горизонтах, таких как глубинные фракционные воды карбонатов в Калифорнии (номер доступа Генбанка KF939375), подземные воды в Южной Африке (DQ251787) и щелочные термальные воды в Дании (AY753399), что подтверждает его происхождение из глубинных горизонтов.

В дополнение к водороду, штамм рос на формиате или смеси формиата с ацетатом. Эксперименты показали отсутствие роста штамма Tu-874 на других органических донорах электрона, включая лактат, пируват, этанол, глюкозу и фруктозу, демонстрируя облигатную хемолитотрофию. Ближайшим родственником штамма является "*Candidatus* Desulforudis audaxviator", хотя значительное расхождение последовательностей гена 16S рРНК предполагает, что организмы относятся к разным родам и, возможно, к разным семействам. В отличие от "*Candidatus* Desulforudis audaxviator", использующего широкий спектр органических доноров электрона, Tu-874 растет только на C1-соединениях. Электронная микроскопия выявила в клетках Tu-874 электронно-плотные включения, аналогичные предполагаемым ацидокальцисомам десульфорудиса. "*Candidatus* Desulforudis audaxviator" был обнаружен в различных географически удаленных экосистемах (Kjeldsen et al., 2007; Tiago, Veríssimo, 2013). Обнаружение Tu-847 и характер его роста свидетельствует о том, что отличные от десульфорудиса, но кластеризующиеся с ним в отдельную филогенетическую группу бактерии могут населять подземные горизонты. Энергетический метаболизм представителей группы основан на неорганических источниках энергии для восстановления сульфата. Факт низкого содержания сульфата в подземной воде может предполагать его использование в процессе сульфатредукции, косвенным подтверждением чего является высокое содержание бария и стронция. Дальнейшее определение последовательности генома прояснит таксономический уровень новой группы, представителем которой является Tu-874, а также идентифицирует наличие или отсутствие биохимических путей использования органических доноров электронов для сульфатредукции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим Романа Латынцева за помощь в отборе проб воды и матов в Тюмени.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование поддержано грантом РНФ № 18-14-00130.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов: И.А. Панова – культивирование; М.А. Григорьев – культивирование; Л.Б. Глухова –

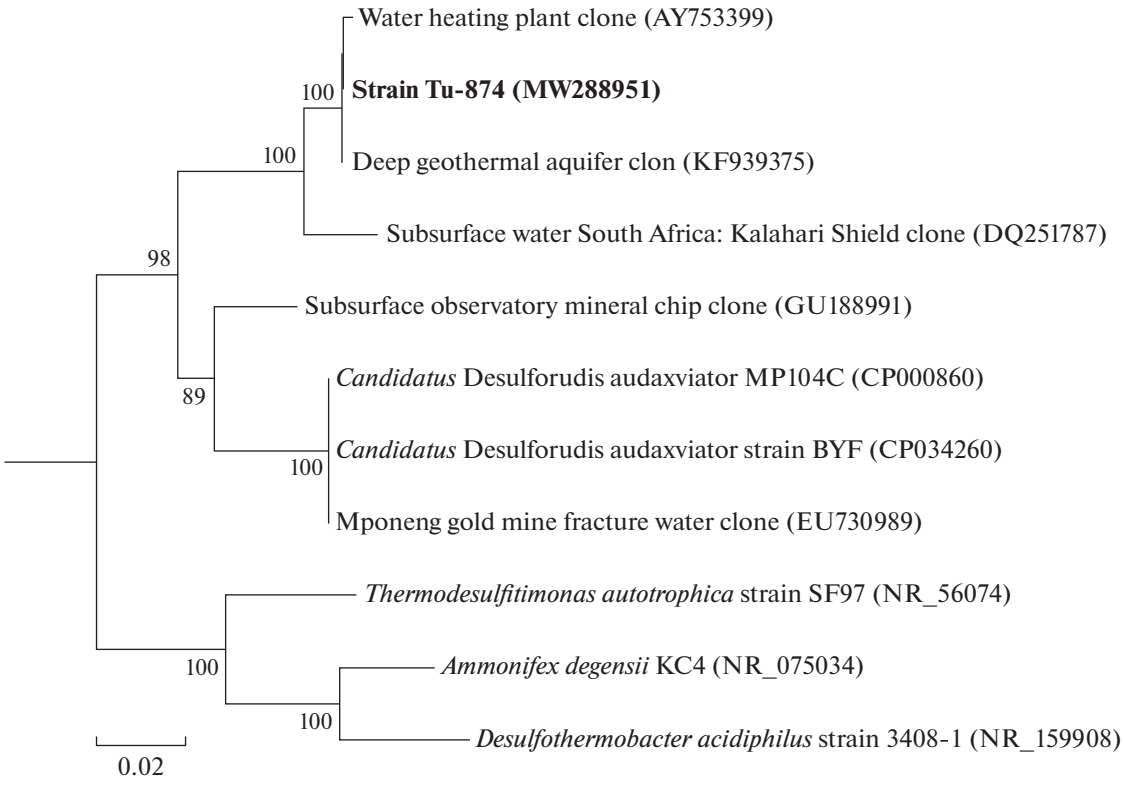

Рис. 2. Дерево, показывающее филогенетическое положение штамма Tu-874 на основе анализа последовательностей гена 16S рРНК, определенное методом Neighbor-Joining. Бутстрепы рассчитаны из 1000 итераций. Дерево построено с использованием MEGA X.

выделение и амплификация ДНК; М.Р. Авакян – филогенетический анализ; О.В. Карначук – планирование экспериментов, отбор проб, написание статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Atri D. On the possibility of galactic cosmic ray-induced radiolysis-powered life in subsurface environments in the Universe // J. R. Soc. Interface. 2016. V. 13. Art. 20160459.

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 reveals a single-species ecosystem deep within Earth // Science. 2008. V. 10. P. 275–278.

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.

Gregory S.P., Barnett M.J., Field L.P., Milodowski A.E. Subsurface microbial hydrogen cycling: natural occurrence and implications for industry // Microorganisms. 2019. V. 7. Art. 53.
https://doi.org/10.3390/microorganisms7020053

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.

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.

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.

Lukina A.P., Avakyan M.R., Danilova E.V., Karnachuk O.V. Application of microbial mats for the isolation of spore-forming prokaryotes from deep biosphere // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 748–752.

Lukina A.P., Frank Y.A., Ivasenko D.A., Glukhova L.B., Danilova E.V., Avakyan M.R., Karnachuk O.V. Isolation of new thermophilic sulfidogens from microbial mat associated with groundwater discharge in the Tunkin valley // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 642–645.

Mardanov A.V., Panova I.A., Beletsky A.V., Avakyan M.R., Kadnikov V.V., Antsiferov D.V., Banks D., Frank Y.A., Pimen-

ov 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. P. fiw111.

Tiago I., Veríssimo A. Microbial and functional diversity of a subterrestrial high pH groundwater associated to serpentinization // Environ. Microbiol. 2013. V. 15. P. 1687–1706.

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 a Novel Chemolithothrophic Sulfate-Reducing Firmicute from a Tyumen Thermal Borehole

I. A. Panova[1], M. A. Grigoriev[1], L. B. Glukhova[1], M. R. Avakyan[1], and O. V. Karnachuk[1, *]

[1]*Department of Plant Physiology, Biotechnology, and Bioinformatics, Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia*

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

Received November 25, 2020; revised December 1, 2020; accepted December 1, 2020

Abstract—Hydrogen is a key *energy*-yielding substrate for microbial processes in the deep biosphere. Fracture water of a deep gold mine in South Africa is a well-known example of the ecosystem based on a hydrogenotrophic sulfate reducer, "*Candidatus* Desulforudis audaxviator." The present work reports the cultivation and pure culture isolation of a novel obligate chemolithotroph reducing sulfate during growth on hydrogen or formate. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of the strain Tu-874 showed its clusterization with its closest cultured relative, "*Candidatus* Desulforudis audaxviator." However, the low 16S rRNA sequence similarity of 88.95% indicates that the organism represents a new taxonomic group above the species level.

Keywords: deep biosphere, "*Candidatus* Desulforudis audaxviator," sulfate-reducing bacteria, cultivation, chemolithotrophs