

На правах рукописи

РЫЖМАНОВА ЯНА ВЛАДИМИРОВНА

**НОВЫЕ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫЕ АНАЭРОБНЫЕ БАКТЕРИИ,
ВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ СЕРЫ И ЖЕЛЕЗА**

Специальность: 03.02.03 – Микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино - 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН).

Научный руководитель: **Щербакова Виктория Артуровна,**
кандидат биологических наук, заведующая лабораторией анаэробных микроорганизмов ИБФМ РАН

Официальные оппоненты: **Горленко Владимир Михайлович,**
доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией экологии и геохимической деятельности микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук

Потехина Наталья Викторовна,
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологически активных веществ кафедры микробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

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

Защита состоится «15» октября 2015 г. в 14 час на заседании Диссертационного совета Д 002.121.01 при ИБФМ РАН по адресу:
142290, г. Пушкино Московской области проспект Науки, д.5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБФМ РАН.
Автореферат размещен на сайтах <http://vak.ed.gov.ru> и <http://www.ibpm.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.В. Кулаковская

Актуальность проблемы. К настоящему времени известным фактом является участие микроорганизмов в природных биогеохимических циклах. Анаэробные микроорганизмы принимают участие в процессах восстановления соединений переменновалентных элементов, к которым относятся сера и железо. Сульфатвосстанавливающие прокариоты – это обширная группа микроорганизмов, объединяющая археи и бактерии, представители которой способны, кроме соединений серы, восстанавливать соединения железа, марганца, мышьяка, хрома и других элементов. Сульфатредукторы населяют различные экосистемы и хорошо адаптированы к экстремальным условиям существования.

Несмотря на общепринятое представление о низких скоростях биохимических реакций, идущих при пониженных температурах, глобальный вклад низкотемпературных микробных сообществ может быть значительным, учитывая масштабы занимаемых ими территорий. В последнее время интерес к микроорганизмам холодных экосистем активизировался еще и в связи с угрозой глобального потепления, в случае которого огромное количество захороненного органического вещества окажется вновь вовлеченным в биогеохимические циклы с участием присутствующей микрофлоры. Все перечисленные факторы обусловили активное развитие относительно новой области микробиологии – исследования холодоустойчивых микроорганизмов и микробных сообществ (Cowan et al., 2002; Deming, 2002; Priscu et al., 2004; Rivkina et al., 2004; Trotsenko et al., 2005; Steven et al., 2006). Уникальной экологической нишей являются криопэги – закрытые водные системы морского происхождения, залегающие в мерзлых толщах возрастом 6-120 тысяч лет на глубине нескольких десятков метров в виде линз хлоридно-натриевых вод, характеризующиеся постоянной отрицательной температурой и высокой минерализацией (Gilichinsky et al., 2005). Как показали исследования последнего десятилетия, криопэги являются местом обитания психрофильных, психротрофных и галофильных микроорганизмов. Арктические криопэги характеризуются высоким содержанием сульфата (0.62-3.84 г/л) и населены сульфатредукторами, которые осуществляют в них терминальную стадию разрушения органического вещества (Gilichinsky et al., 2003; Печерицына и др., 2007). Однако на данный момент выделен и описан лишь один психроактивный сульфатредуктор из распресненного криопэга полуострова Варандей – *Desulfovibrio arcticus* (Pecheritsyna et al., 2012). Исследования сульфатвосстанавливающих бактерий (СВБ) криопэгов методами молекулярной биологии до настоящего времени не проводились.

Содовые озера распространены во внутриконтинентальных аридных районах и по своим характеристикам относятся к экстремальным системам из-за высокой минерализации (от 10 до 475 г/л) и рН (от 8.5 до 11). Первые комплексные микробиологические исследования центрально-азиатских содовых озер были проведены в Кулундинской степи Б.Л. Исаченко в 30-х годах XX века (Исаченко, 1951). Исследования были возобновлены в 90-х годах во многом благодаря гипотезе Г.А. Заварзина о том, что микробные сообщества внутриконтинентальных содовых водоемов могут рассматриваться как реликтовый аналог наземной биоты раннего протерозоя и, возможно, могли являться центрами микробного биоразнообразия (Заварзин, 1993; Заварзин и др., 1999; Zavarzin et al., 2000). В результате изучения этих экосистем, были выделены представители почти всех микроорганизмов, обеспечивающих замкнутость циклов основных биогенных элементов в содовых озерах. Описанию микрофлоры содовых водоемов как целостных экосистем посвящен ряд обзоров (Заварзин и др., 1999; Заварзина и др., 2012; Tindall, 1988; Grant et al., 2000; Zavarzin et al., 2000; Sorokin et al., 2011a, 2014a). Изучение разнообразия и распространения СВБ в соленых

и гиперсоленых содовых озерах Африки, Алтая и Северной Америки показало доминирование в них родов *Desulfonatronovibrio*, *Desulfonatronum* и *Desulfonatronospira* (Scholten et al., 2005; Foti et al., 2007; Sorokin et al., 2010a; Sorokin et al., 2011a). Однако исследования биоразнообразия СВБ содовых озер Бурятии молекулярными методами до сих пор не проводились. Также до настоящего времени не было известно случаев описания алкалофильной железоредукции, осуществляемой сульфатвосстанавливающими бактериями.

В настоящее время изучение микроорганизмов экстремальных экосистем создает основы для новых биотехнологических разработок (Horikoshi, 1999; Podar et al., 2006; Cavicchioli et al., 2011; Zhang et al., 2011). Выделенные и охарактеризованные экстремофильные и экстремотолерантные микроорганизмы представляют интерес как модели для изучения механизмов адаптации и способов стабилизации биомолекул и целых клеток при воздействии различных физико-химических факторов, а также являются возможными источниками получения криопротекторов и ферментов, стабильных в широком диапазоне pH, солености и температуры.

Цель данной работы – поиск, количественная оценка и идентификация анаэробных бактерий, способных использовать соединения серы и железа в качестве акцепторов электронов, в криопэгах полуострова Ямал и донных осадках содовых озер Соленое и Сульфатное (Южная Бурятия) с использованием микробиологических и молекулярно-биологических методов.

Задачи работы:

1. Оценка численности сульфатредукторов в криопэгах полуострова Ямал и донных осадках содовых озер Соленое и Сульфатное с помощью метода ПЦР “в реальном времени” (ПЦР-РВ).
2. Разработка праймеров для детекции алкалофильных сульфатредукторов рода *Desulfonatronum* в природных экосистемах.
3. Выделение новых экстремофильных анаэробных бактерий из содовых озер и криопэгов и их физиолого-биохимическая и филогенетическая характеристика.
4. Изучение способности новых изолятов алкалофильных сульфатредукторов восстанавливать Fe(III) в щелочных условиях.

Научная новизна работы. Впервые проведена оценка численности сульфатредукторов в двух экстремальных экосистемах – содовых озерах Соленое и Сульфатное (Южная Бурятия) и криопэгах полуострова Ямал – методом ПЦР-РВ. В результате численность СВБ в образцах донных осадков содовых озер составила 7.9×10^4 – 2.4×10^6 копий гена *dsrA*/г, а в воде криопэгов – 2.7×10^2 – 6.9×10^3 копий гена *dsrAB*/мл.

Получены новые данные о видовом разнообразии и метаболическом потенциале сульфатвосстанавливающих бактерий содовых озер и криопэгов. Из арктического криопэга выделен новый психротолерантный галофильный сульфатредуктор, являющийся представителем нового вида ‘*Desulfovibrio algoritolerans*’ sp. nov., способный расти при отрицательных температурах и восстанавливать Fe(III). Из донных осадков содовых озер выделены и охарактеризованы три штамма галотолерантных алкалофильных СВБ. Описан новый вид алкалофильных сульфатредукторов *Desulfonatronum buryatense* sp. nov. Выделена и охарактеризована бактерия-спутник алкалофильных сульфатредукторов – протеолитическая аммонифицирующая бактерия ‘*Anoxynatronum buryatense*’ sp. nov., характеризующаяся способностью восстанавливать соединения серы в процессе роста. Впервые у представителей алкалофильных сульфатредукторов обнаружена способность к восстановлению трехвалентного железа в условиях высокой щелочности среды.

Практическая значимость. Разработаны и экспериментально проверены новые пары праймеров на ген *dsrA*, являющийся маркерным для сульфатвосстанавливающих бактерий, и ген 16S рРНК сульфатредукторов рода *Desulfonatronum*, подходящие для использования в ПЦР “в реальном времени”. Новый психротолерантный галофильный сульфатредуктор ‘*Desulfovibrio algotolerans*’ K3S^T может представлять интерес как источник холодоактивных ферментов, а также как компонент искусственно создаваемых сообществ, способных к биодegradации поллютантов в условиях холодного климата. Галоалкалофильные штаммы видов *Desulfonatronum buryatense* Ki5^T и ‘*Anoxyatronum buryatense*’ Su22^T также могут найти применение в системах биоремедиации, осуществляя удаление токсичных ионов металлов и серы из сточных вод с повышенными значениями солености и рН.

Апробация работы. Материалы работы представлены на российских и международных конференциях: “Биология - наука XXI века- 2009, 2013”, на всероссийском симпозиуме с международным участием “Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов – 2009”, на международной конференции “10th European Workshop on Astrobiology EANA’2010”, на международной конференции “The 5th FEMS Congress of European Microbiologists – 2013”, на 10-м международном конгрессе “Extremophiles 2014” (Санкт-Петербург, Россия).

Публикации. Материалы диссертации представлены в 8 печатных работах: 2 экспериментальных статьи и 6 тезисах.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 113 страницах машинописного текста и включает 22 рисунка и 15 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, содержащей методы, результаты исследования и их обсуждение, выводов и списка литературы, который включает 230 наименований.

Место проведения работы и благодарности. Работа выполнена в лаборатории анаэробных микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук (ИБФМ РАН). Автор выражает искреннюю благодарность Щербаковой В.А. и всему коллективу лаборатории анаэробных микроорганизмов за практическую помощь, ценные советы и поддержку при написании диссертации. Особую благодарность хочется выразить к.б.н. Аriskиной Е.В. (ИБФМ РАН) за помощь в определении Г+Ц состава ДНК и проведении анализа ДНК-ДНК гибридизации; к.б.н. Сузиной Н.Е. и к.б.н. Абашиной Т.Н. (ИБФМ РАН) за помощь в проведении микроскопических исследований; к.б.н. Автуху А.Н. (ИБФМ РАН) за помощь в определении продуктов метаболизма; д.б.н. Осипову Г.А. за определение жирнокислотного состава клеток; д.б.н. Сорокину Д.Ю. (ИНМИ РАН) за предоставленные культуры СВБ; д.б.н., проф. Намсараеву Б.Б. (ИОЭБ СО РАН) за предоставленные образцы донных осадков содовых озер; к.г.-м.н. Демидову Н.Э. (ИФХиБПП РАН) за предоставленные образцы воды ямальских криопэгов, а также д.б.н. Хмелениной В.Н., к.б.н. Решетникову А.С. и д.б.н. Троценко Ю.А. (ИБФМ РАН) за ценные советы при написании диссертации.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись 4 образца донных осадков содового озера Солёное (Селенгинский район, Бурятия) (глубина отбора проб 0-5, 15-17, 19-21 и 23-25 см) и 1

образец поверхностных донных осадков содового озера Сульфатное (Кяхтинский район, Бурятия) (глубина отбора пробы 0-5 см), полученные от д.б.н., проф. Б.Б. Намсараева (ИОЭБ СО РАН), а также образцы воды трех криопэгов полуострова Ямал, предоставленные к.г.-м.н. Н.Э. Демидовым (ИФХиБПП РАН). Гидрохимические характеристики воды озер Соленое, Сульфатное и криопэгов приведены в Таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Гидрохимическая характеристика воды озер Сульфатное и Соленое

Озеро	Т°С	рН	Еh, мВ	Соленость, г/л	Концентрация, мг/л			
					CO ₃ ²⁻	HCO ₃ ⁻	S ²⁻	SO ₄ ²⁻
Сульфатное	22.1	9.1	+290	4.9	150.0	854.0	< 1	1400
Соленое	14.3	9.9	+380	14	360.0	2342.8	7.5	723.1

Таблица 2. Гидрохимическая характеристика воды криопэгов полуострова Ямал

Криопэг	Место отбора	Глубина отбора, м	рН	Минерализация, г/л	Ионный состав воды, г/л						
					Катионы				Анионы		
					K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻
1У	Бованенковское газовое месторождение	120	7.9	14.6	0.12	0.196	2.0	2.04	0.46	9.59	0.19
2У	Устье р. Ярояха	5	7.4	56.23	0.85	16.35	0.52	2.38	1.02	31.24	2.88
3У	Пойма р. Ярояха	12.5-20.0	7.5	77.16	0.41	22.68	1.04	3.79	1.71	47.22	0.31

Объектами исследования также служили **чистые и накопительные культуры анаэробных бактерий**, выделенные из образцов донных осадков содовых озер и воды криопэгов полуострова Ямал. Для сравнительных экспериментов использовали штаммы СВБ, полученные из коллекций ВКМ (Россия), DSMZ (Германия), а также любезно предоставленные д.б.н. Д.Ю. Сорокиным (ИНМИ РАН). Рост СВБ оценивали по накоплению сульфида, рост штамма Su22^T и *A. sibiricum* В-2327^T – по оптической плотности при длине волны 600 нм.

Учет численности бактерий микробиологическими методами осуществляли методом прямого счета (МПС) по Разумову (1962) и методом предельных разведений.

Чистоту культур проверяли прямым наблюдением клеток в световой микроскоп Axiostar PLUS (Carl Zeiss, Германия) с фазовым контрастом при увеличении 100×3.5, а также по отсутствию роста посторонней микрофлоры на основной среде с добавлением пептона (1.0 г/л) и глюкозы (2.0 г/л).

Морфологию клеток изучали с помощью светового микроскопа Axiostar PLUS (Carl Zeiss, Германия) при увеличении 100×3.5, а также на электронном микроскопе JEM-100B (Jeol, Япония). Электронно-микроскопические исследования ультратонких срезов, полученных на ультратоме LKB-3 (LKB, Швеция), проводили по методу Рейндольса (Reynolds, 1963).

Культуральные свойства и физиологические особенности новых изолятов изучали по общепринятым методикам (Powell, 1983; Gerhardt, 1994).

Определение продуктов брожения и окисления (ацетат, пропионат, бутират, изобутират, валерат, гексаноат и гептаноат) проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Knauer (Германия). Спирты определяли методом газовой хроматографии на хроматографе Pye Unicam 300 (Великобритания) с пламенно-ионизационным детектором. **Сероводород** определяли по методу Cline (1969). Содержание **лактата** в среде определяли

ферментативным способом (Hohorst, 1970). **Определение ионов двухвалентного железа** осуществляли путем экстракции ионов Fe²⁺ феррозином (Lovley et al., 1986).

Определение десульфовиридина проводили по методике Постгейта (Postgate, 1959). Состав **цитохромов** определяли спектрофотометрически на двухлучевом спектрофотометре Shimadzu UV-160 (Япония) при длинах волн 552, 523 и 420 нм.

Анализ жирнокислотного состава клеток проводили на приборе Sherlock (MIDI Inc. Delaware, США) в автоматическом режиме.

Выделение хромосомной ДНК из 5 природных образцов донных осадков проводили с помощью Ultra Clean Mega Prep Soil DNA Kit (МО ВЮ, США). ДНК из воды криопэггов выделяли набором “Томо-Сорб” (Синтол, Россия). Выделение хромосомной ДНК чистых культур проводили модифицированным методом Мармура (Marmur, 1961).

Определение и расчет содержания Г+Ц пар в ДНК осуществляли по температуре плавления ДНК (Mesbah et al., 2011; Owen et al., 1985) на спектрофотометре DU800 Beckman Coulter (Beckman, США).

ДНК-ДНК гибридизацию проводили в соответствии с протоколом Rossello-Mora с соавт. (Rossello-Mora et al., 2011) на спектрофотометре DU800 Beckman Coulter (Beckman, США).

Разработка праймеров *in silico*. Поиск нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и *dsrAB* СВБ проводили в международной базе данных GenBank. Процедуру выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, а также поиск консервативных участков осуществляли с помощью программы CLUSTAL W (Larkin et al., 2007).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе Терцик (ДНК-Технология, Россия). В Таблице 3 представлены праймеры, использованные в работе.

Таблица 3. Праймеры, использованные в работе

Праймер	Ген - мишень	Последовательность (5'-3')	Темп. отжига, °С	Литературный источник
27f	16S рРНК бактерий	AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG	55	Lane et al., 1991
1492r	16S рРНК бактерий	ACGG(C/T)TACCTTGTACGACTT	55	Lane et al., 1991
DSR1F	<i>dsrAB</i>	AC(C/G)CACTGGAAGCACG	55	Wagner et al., 1998
DSR4R	<i>dsrAB</i>	GTGTAGCAGTTACCGCA	55	Wagner et al., 1998
DSR170f	<i>dsrAB</i>	TGACCAACATGCACGGCTCC	53	наши исследования
DSR860r	<i>dsrAB</i>	TGCCTTCTTCCATCCACCA(G/A)T CCCA	53	наши исследования
Natr_F	16S рРНК рода <i>Desulfonatronum</i>	CTAGAGAGACTGCCCCGGTTA	63	наши исследования
Natr_R	16S рРНК рода <i>Desulfonatronum</i>	CTGCAATCCGAAGTGTGGTGA	63	наши исследования

ПЦР “в реальном времени” (ПЦР-РВ) проводили на амплификаторе АНК32 (Россия). В качестве калибровочного стандарта использовали десятикратные разведения геномной ДНК *Desulfovibrio arcticus* B15^T или *Desulfonatronum lacustre* Z-7951^T. Анализ результатов проводили с использованием программного обеспечения, поставляемого с прибором.

Секвенирование нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и *dsrAB* проводили в ЦКП “Геном” ИМБ РАН (г. Москва) с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems (США).

Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей и построение дендрограмм проводили с использованием пакета программ MEGA6 (Tamura et al., 2013).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Определение численности бактерий в криопэгах полуострова Ямал

Оценку общей численности бактерий в образцах воды трех криопэгов осуществляли методом прямого счета (МПС) и методом ПЦР “в реальном времени” (ПЦР-РВ) с использованием универсальных бактериальных праймеров 27f/1492r на ген 16S рРНК. В результате общая численность бактерий, полученная с помощью ПЦР-РВ, составила 5.2×10^8 и 1.2×10^7 копий гена 16S рРНК/мл в криопэгах 1У и 3У, соответственно. Численность бактерий, полученная методом прямого счета, составила 8.2×10^8 , 4.2×10^7 и 3.2×10^6 кл/мл в криопэгах 1У, 2У и 3У, соответственно (Таблица 4). Для определения общего количества СВБ использовали метод предельных разведений (МПР) и ПЦР-РВ с применением стандартной пары праймеров DSR1F/DSR4R (Wagner et al., 1998) на ген бисульфитредуктазы *dsrAB*. СВБ были обнаружены в криопэгах 1У и 3У в количестве 6.9×10^3 и 2.7×10^2 копий гена *dsrAB*/мл, соответственно. Порядок численности СВБ соответствует данным, полученным МПР: 2×10^3 и 2×10^2 кл/мл в криопэгах 1У и 3У, соответственно.

Таблица 4. Общая численность бактерий и сульфатредукторов в криопэгах Ямала

Криопэг	Минерализация, г/л	Общая численность бактерий		Общая численность СВБ	
		МПС*, кл/мл	ПЦР-РВ**, копий гена 16S рРНК/мл	МПР***, кл/мл	ПЦР-РВ, копий гена <i>dsrAB</i> /мл
1У	14.6	8.2×10^8	5.2×10^8	2×10^3	6.9×10^3
2У	56.23	4.2×10^7	н.о.	0	0
3У	77.16	3.2×10^6	1.2×10^7	2×10^2	2.7×10^2

*МПС - метод прямого счета; **ПЦР-РВ - ПЦР “в реальном времени”; ***МПР - метод предельных разведений; н.о. - не определяли.

Для оценки эффективности подбора селективных условий в накопительных культурах ямальских криопэгов K1S, K2S и K3S для роста сульфатредукторов при разных температурах культивирования был применен метод ПЦР-РВ. Накопительные культуры выращивали при 6 и 15°C в течение 60 дней. Тотальную ДНК, выделенную из накопительных культур, использовали в ПЦР-РВ с праймерами DSR1F/DSR4R на ген *dsrAB*. Анализ полученных данных показал, что численность СВБ в накопительной культуре K1S увеличилась с 10^3 до 10^4 , а в накопительной культуре K3S – с 10^2 до 10^5 копий гена *dsrAB*/мл по сравнению с начальной численностью сульфатредукторов в воде криопэгов (Таблицы 4, 5). В накопительной культуре K2S, как и в образце воды криопэга 2У, СВБ не были обнаружены, что может быть связано с их полным отсутствием или низкой численностью, не превышающей пороговый уровень чувствительности пары праймеров DSR1F/DSR4R, наличием представителей новых родов СВБ, не амплифицирующихся с данной парой праймеров, или созданием неоптимальных селективных условий в накопительной культуре для присутствующих в образце СВБ.

Таблица 5. Численность СВБ в накопительных культурах при различных температурах культивирования

Накопительная культура	Численность СВБ в накопительной культуре, копий гена <i>dsrAB</i> /мл	
	6°C	15°C
K1S	5.8×10^4	2.7×10^4
K2S	0	0
K3S	7.9×10^5	1.9×10^5

2. Психротолерантный сульфатредуктор из криопэга полуострова Ямал

Из накопительной культуры криопэга 3У выделен штамм СВБ, обозначенный К3S^T. Изолят представлен подвижными одиночными грамотрицательными вибрионами размером 0.5×2.0 мкм. Штамм подвижен за счет двух монополярных очехленных жгутиков (Рисунок 1). Споры не обнаружены.

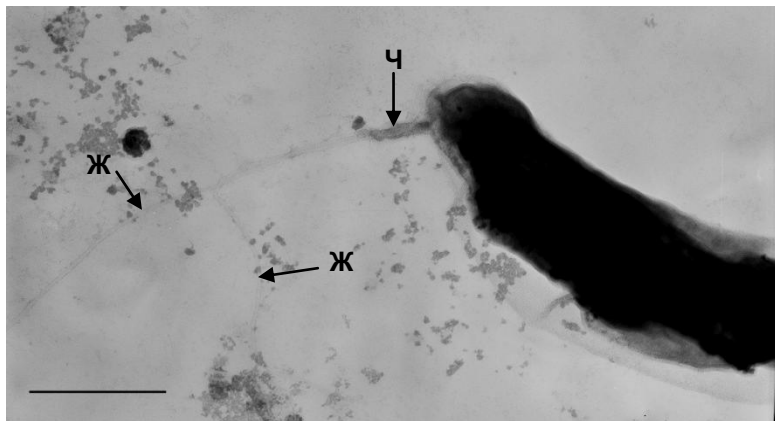


Рисунок 1. Морфология клеток штамма К3S^T.

Ж - жгутик, Ч - чехол жгутика. Длина масштабной линейки – 1 мкм.

Штамм К3S^T является психротолерантным и способен расти при температурах от -2 до 36°C, оптимум 26°C (Рисунок 2 а). Рост при температуре -2°C сопровождается образованием 2.65 мМ сульфида в течение 35 дней. Исследуемый изолят является умеренным галофилом, облигатно зависит от присутствия ионов Na⁺ в среде и растет в диапазоне NaCl от 5 до 40 г/л с оптимумом при 20 г/л (Рисунок 2 б). Изолят является нейтрофилом и растет в узком диапазоне рН от 6.8 до 7.4 с максимальной скоростью роста при рН 7.0-7.2.

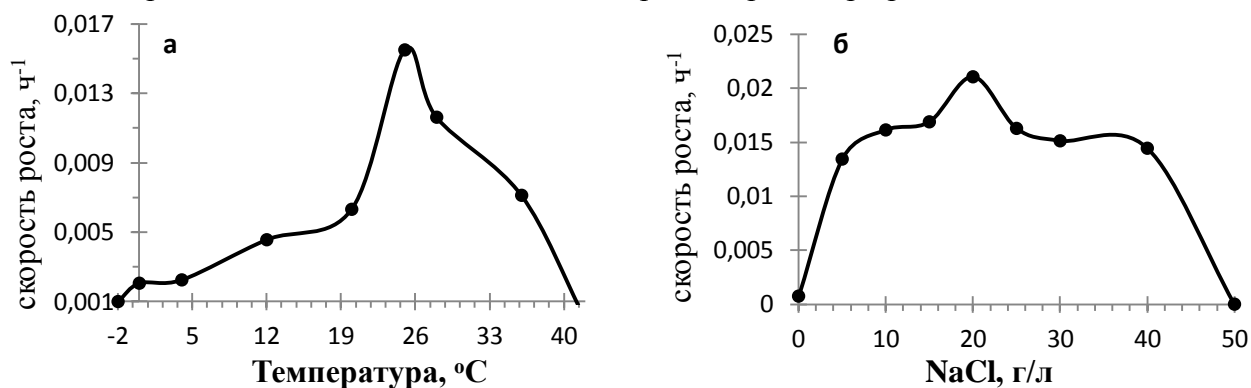


Рисунок 2. Влияние температуры (а) и NaCl (б) на скорость роста штамма К3S^T.

Штамм К3S^T способен использовать лактат, формиат, пируват, фумарат, аланин, этанол и молекулярный водород в качестве доноров электронов в присутствии сульфата, причем наибольшее образование сульфида (7.9 мМ) происходило при росте на аланине.

Помимо сульфата как конечного акцептора электронов, штамм К3S^T использует сульфит, тиосульфат и элементарную серу. Штамм К3S^T способен также восстанавливать Fe(III) цитрат и Fe(III) ЭДТА без видимого роста.

Содержание Г+Ц пар в ДНК штамма К3S^T составляет 42.3 мол. %.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК показал, что штамм К3S^T кластеризуется с бактериями рода *Desulfovibrio*. На филогенетическом древе (Рисунок 3) его ближайшим соседом с 97.4% сходства является *D. ferrireducens* DSM 16995^T – бактерия, выделенная из донных отложений Арктического шельфа в районе о. Шпицберген (Vandieken et al., 2006). Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма К3S^T депонирована в GenBank под номером KJ739728.

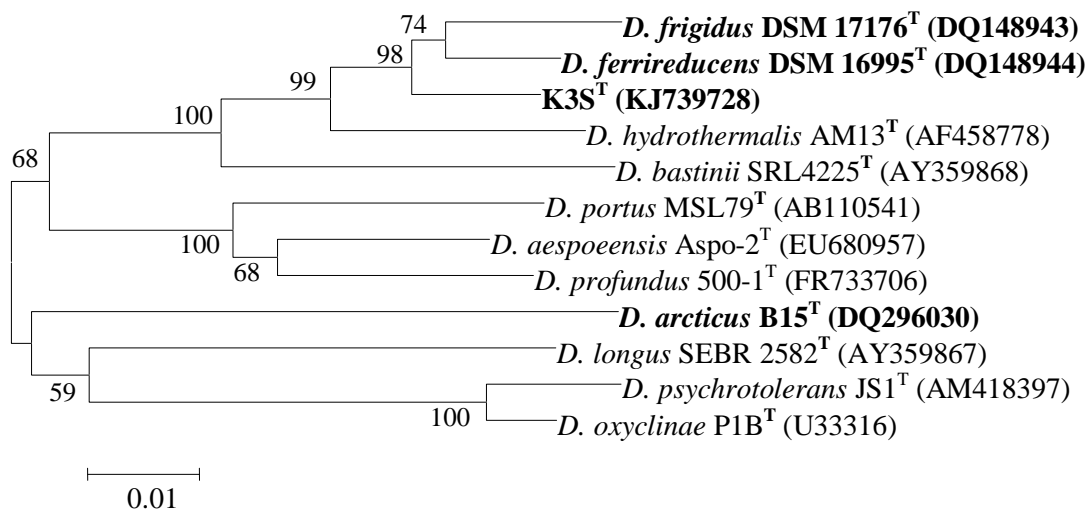


Рисунок 3. Филогенетическое древо, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, показывающее положение штамма K3S^T среди представителей рода *Desulfovibrio*. СББ арктических экосистем показаны жирным шрифтом. Учетный номер базы данных GenBank указан в скобках. Дендрограмма построена с использованием метода “neighbour-joining”. Данные “bootstrap”-анализа (выраженные в процентах от 1000 реплик) указаны в точках ветвления.

Таблица 6. Сравнительная характеристика штамма K3S^T с представителями рода *Desulfovibrio*, выделенными из арктических экосистем

Признак	K3S ^T	<i>D. ferrireducens</i> DSM 16995 ^T	<i>D. frigidus</i> DSM17176 ^T	<i>D. arcticus</i> B15 ^T
Жгутики	монополярное битрихальное	Монотрих	Монотрих	Монотрих
Размер, мкм	0.5×2.0	0.7×2.5-5.5	0.7×2.0-5.0	0.4-0.5×3.0-4.0
рН				
пределы	6.8-7.4	6.3-7.5	6.9-7.5	5.5-8.5
оптимум	7.0-7.2	7.1-7.5	7.1	6.7-7.0
Температура, °С				
пределы	-2-36	-2-30	-2-25	-2-28
оптимум	26	23	20-23	24
NaCl, г/л				
пределы	5-40	7-40	20-35	0-20
оптимум	20	10-25	20-30	2
Доноры электронов/+SO₄				
Пируват	+	-	-	+
Фумарат	+	+	+	-
Аланин	+	-	+	-
Акцепторы электронов/+лактат				
Тиосульфат	+	+	-	+
Сера	+	-	+	+
аморфное Fe(III)	-	+/-	+/-	+/-
Fe(III) цитрат	+/-	+/-	+/-	н.д.
Fe(III) ЭДТА	+/-	н.д.	н.д.	+/-
Г+Ц, мол. %	42.3	42.0	43.3	55.2
Авторы описания	Наши исследования	Vandieken et al., 2006a	Vandieken et al., 2006a	Pecheritsyna et al., 2012

+/- , восстановление субстрата без роста; н.д.- нет данных.

По ряду фенотипических и физиолого-биохимических признаков штамм K3S^T оказался близок к представителям уже известных психротолерантных сульфатредукторов рода *Desulfovibrio* (Таблица 6).

Сравнение свойств штаммов K3S^T и *D. ferrireducens* DSM 16995^T показало, что их объединяет способность к росту на лактате, формиате, водороде, fumarate и этаноле, а также к восстановлению сульфата, сульфита и тиосульфата. Оба штамма являются нейтрофилами и способны расти при отрицательных температурах. Штамм K3S^T, как и *D. ferrireducens* DSM 16995^T, является умеренным галофилом и облигатно нуждается в ионах Na⁺. Кроме того, новый изолят, как и его ближайшие родственники, способен восстанавливать цитрат Fe(III) и ЭДТА Fe(III) без видимого роста. В отличие от *D. ferrireducens*, штамм K3S^T использует пируват и аланин в качестве донора электронов, а также элементную серу как акцептор электронов.

Уровень сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК штамма K3S^T и *D. ferrireducens* DSM 16995^T, составляющий 97.4%, а также ряд фенотипических отличий свидетельствуют о том, что штамм K3S^T является новым психротолерантным видом рода *Desulfovibrio*, для которого предложено название '*Desulfovibrio algoritolerans*' sp. nov.

3. Обнаружение СВБ в содовых озерах Соленое и Сульфатное

Для поиска сульфатвосстанавливающих бактерий в щелочных экосистемах нами были исследованы 4 образца донных осадков озера Соленое и 1 образец поверхностных донных осадков озера Сульфатное. Из пяти образцов была выделена тотальная ДНК, которую использовали для обнаружения СВБ методом ПЦР с применением стандартной пары праймеров DSR1F/DSR4R на ген бисульфитредуктазы *dsrAB*. В результате были получены ПЦР-фрагменты ожидаемой длины 1900 н.о. из ДНК всех образцов (Рисунок 4 а), что доказывало присутствие СВБ в донных осадках озер Соленое и Сульфатное.

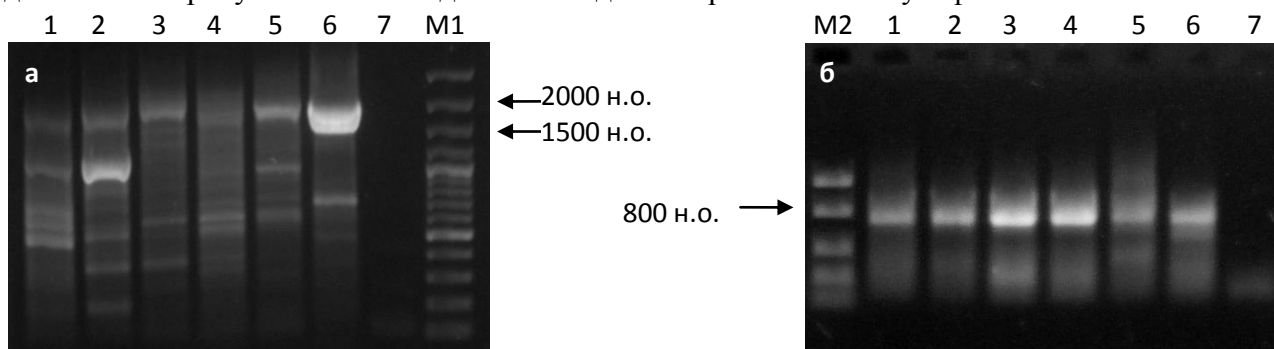


Рисунок 4. Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации фрагментов гена *dsrAB* с использованием праймеров DSR1F/DSR4R (а) и DSR170f/DSR860r (б): 1 – оз. Соленое (0-5 см), 2 – оз. Соленое (15-17 см), 3 – оз. Соленое (19-21 см), 4 – оз. Соленое (23-25 см), 5 – оз. Сульфатное (0-5 см), 6 – *D. lacustre* (положительный контроль), 7 – контрольная ПЦР без ДНК. М1 - маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler™ 100+ н.о. (Fermentas, Литва). М2 – маркер молекулярной массы ДНК FastRuler™ 50-1500 н.о. (Fermentas, Литва).

Однако при использовании праймеров DSR1F/DSR4R образовывалось большое количество неспецифических продуктов амплификации, что ограничивало применение данной пары праймеров для количественной оценки СВБ методом ПЦР-РВ. В связи с этим, следующий этап работы был направлен на разработку новых праймеров для детекции СВБ в щелочных экосистемах, подходящих для ПЦР-РВ.

На основании имеющихся в базе данных GenBank нуклеотидных последовательностей гена *dsrA* сульфатредукторов различных филогенетических подгрупп, нами разработана новая пара праймеров DSR170f/DSR860r. С использованием этой пары праймеров получены ПЦР-фрагменты гена *dsrA* ожидаемой длины (740 н.о.) с ДНК из исследованных образцов

донных отложений содовых озер. Полученные ПЦР-фрагменты не содержали неспецифических продуктов амплификации (Рисунок 4 б).

Известно, что представители рода *Desulfonatronum* являются активным компонентом алкалофильного микробного сообщества содовых озер. Для количественной оценки СВБ этого рода на основе нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК бактерий рода *Desulfonatronum*, имеющихся в базе данных GenBank, нами разработана пара родоспецифичных праймеров Natr_F/Natr_R, позволяющая амплифицировать фрагменты длиной 164 н.о. только с представителями рода *Desulfonatronum*. Новая пара праймеров была использована для поиска бактерий рода *Desulfonatronum* в образцах донных осадков озер Соленое и Сульфатное. ПЦР-фрагменты ожидаемой длины получены с ДНК из всех пяти исследуемых проб (Рисунок 5), что подтвердило наличие представителей рода *Desulfonatronum* в исследуемых озерах.

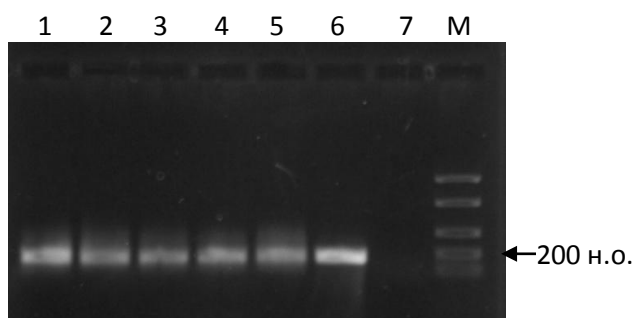


Рисунок 5. Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации фрагментов гена 16S рРНК с использованием праймеров Natr_F/Natr_R: 1 – оз. Соленое (0-5 см), 2 – оз. Соленое (15-17 см), 3 – оз. Соленое (19-21 см), 4 – оз. Соленое (23-25 см), 5 – оз. Сульфатное (0-5 см), 6 – *D. lacustre* (положительный контроль), 7 – контрольная ПЦР без ДНК. М- маркер молекулярной массы ДНК FastRuler™ 50-1500 н.о. (Fermentas, Литва).

4. Определение численности СВБ в содовых озерах Соленое и Сульфатное

Численность СВБ в образцах донных осадков содовых озер Соленое и Сульфатное оценивали методом предельных разведений (МПР) и ПЦР-РВ. Для подсчета общего числа СВБ и численности бактерий рода *Desulfonatronum* использовали разработанные пары праймеров DSR170f/DSR860r на ген *dsrA* и Natr_F/Natr_R на ген 16S рРНК бактерий рода *Desulfonatronum*. Результаты количественной ПЦР показали, что общая численность СВБ в донных осадках озера Соленое составляет $7.9 \times 10^4 - 2.4 \times 10^6$ копий гена *dsrA*/г. При этом наибольшее содержание сульфатредукторов выявлено в поверхностном слое ила (Таблица 7).

Таблица 7. Численность СВБ в образцах донных осадков озер Соленое и Сульфатное

Озеро	Глубина отбора, (см)	Общее число СВБ, копий гена <i>dsrA</i> /г	Численность <i>Desulfonatronum</i> spp., копий гена 16S рРНК/г	Численность <i>Desulfonatronum</i> spp. от общего числа СВБ, %	Общее число СВБ, кл/г (МПР*)
Соленое	0-5	2.4×10^6	1.8×10^6	75	10^4
	15-17	7.9×10^4	3.0×10^4	38	10^5
	19-21	1.9×10^5	2.9×10^4	15.3	10^5
	23-25	1.5×10^5	6.6×10^4	44	10^6
Сульфатное	0-5	1.2×10^5	7.7×10^3	6.5	10^4

*МПР - метод предельных разведений

Численность бактерий рода *Desulfonatronum* в донных отложениях озера Соленое составляет $2.9 \times 10^4 - 1.8 \times 10^6$ копий гена 16S рРНК/г с максимальным количеством этих бактерий в поверхностном слое (75% от общей численности СВБ). В подповерхностных слоях ила озера Соленое численность бактерий рода *Desulfonatronum* составила $2.9 \times 10^4 - 6.6 \times 10^4$ копий гена 16S рРНК/г (15-44% от общей численности СВБ).

В образце поверхностных донных осадков озера Сульфатное общая численность СВБ составила 1.2×10^5 копий гена *dsrA*/г. Численность бактерий рода *Desulfonatronum* в озере

Сульфатное оказалась ниже, чем в озере Соленое (6.5% от общей численности СВБ). Возможно, это связано с преобладанием алкалофильных СВБ других родов, к примеру, *Desulfonatrovibrio* или *Desulfonatronospira*.

Общая численность СВБ в донных осадках озер Соленое и Сульфатное, подсчитанная методом предельных разведений (МПР), составила 10^4 - 10^6 и 10^4 кл/г, соответственно. Расхождение данных численности СВБ, полученных методами ПЦР-РВ и МПР, возможно объясняется недостатком метода предельных разведений, позволяющего подсчитывать только культивируемые виды СВБ, и высокой чувствительностью метода ПЦР-РВ.

Полученные нами результаты подтвердили, что СВБ и, в частности, представители рода *Desulfonatrum*, являются активным компонентом микробного сообщества содовых озер.

5. Новые анаэробные бактерии содовых озер

5.1. Сульфатвосстанавливающие бактерии

Из образцов донных осадков озера Соленое выделены два штамма СВБ – Ki4 и Ki5^T, из донных осадков озера Сульфатное – штамм Su2. Изучение свойств изолятов выполнено в совместных исследованиях с рядом соавторов (Рыжманова и др., 2011; Ryzhmanova et al., 2013). Клетки новых штаммов представлены подвижными неспоровыми одиночными вибрионами разного размера: штамм Ki4 0.6-0.8×2.0-2.5 мкм (Рисунок 6 а), штамм Ki5^T – 0.5-0.7×2.0-2.5 мкм (Рисунок 6 б), штамм Su2 – 0.8-0.9×2.3-2.6 мкм (Рисунок 6 в). Все изоляты имеют клеточную стенку грамотрицательного типа.

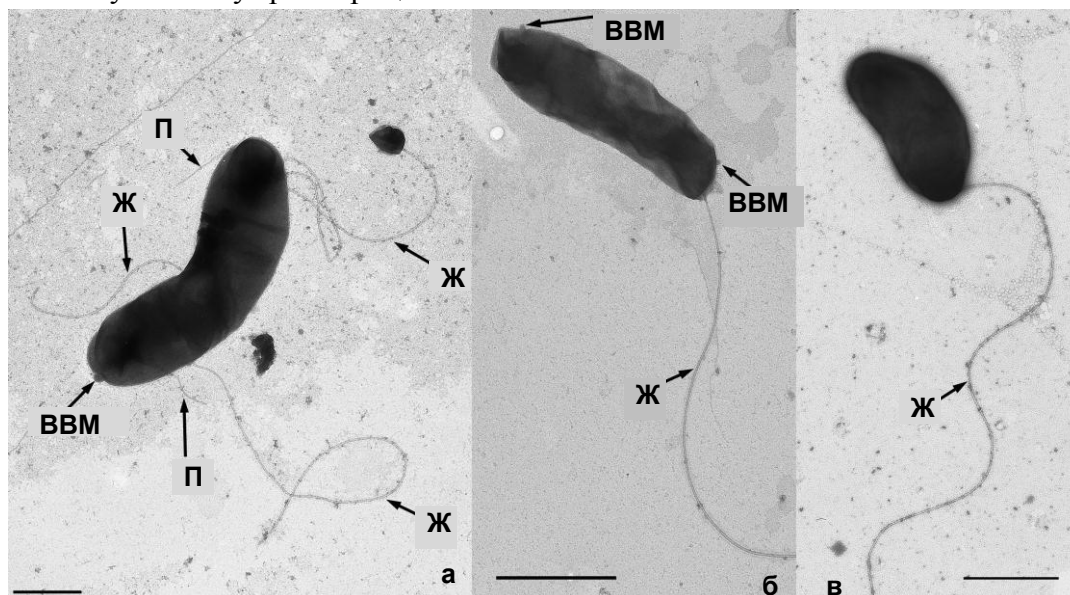


Рисунок 6. Морфология клеток штаммов Ki4 (а), Ki5^T (б), Su2 (в). Ж – жгутик, П – пили, ВВМ – везикулы внешних мембран. Длина масштабной линейки – 1 мкм.

Клетки штаммов Su2 и Ki5^T часто образуют короткие цепочки – спириллы – из 2-3 клеток. Для штамма Ki4 характерно перитрихальное жгутикование и наличие боковых пилей (Рисунок 6 а). Подвижность клеток штаммов Su2 и Ki5^T обусловлена одним полярно расположенным жгутиком (Рисунок 6 б,в). Клетки Ki4 и Ki5^T образуют везикулы внешних мембран.

Все выделенные штаммы являются мезофилами и растут в диапазоне температур от 20 до 40°C. Оптимальной температурой для роста штаммов Ki4 и Su2 является 29°C, для штамма Ki5^T – 34°C. Все три изолята являются облигатными алкалофилами и не растут при рН ниже 7.5. Штамм Ki4 растет в диапазоне рН 7.5-10.0, штамм Ki5^T – 7.5-10.5, штамм Su2 –

8.0-11.5. Максимальные скорости роста наблюдались при pH 8.9, 9.4 и 10.0 для штаммов Ki4, Ki5^T и Su2, соответственно (Рисунок 7). Изоляты растут в широком диапазоне солености: 1-80 г/л NaCl (штамм Ki4), 2-40 г/л NaCl (штамм Ki5^T) и 5-100 г/л NaCl (штамм Su2). Оптимальная концентрация NaCl для роста штаммов Su2 и Ki4 – 10 г/л, для штамма Ki5^T – 5 г/л. Штаммы Ki4 и Ki5^T облигатно нуждаются в ионах Na⁺, эквимоллярная замена солей натрия на соответствующие калиевые соли не поддерживает рост изолятов. Замена хлорид-иона эквимоллярным количеством карбонат-ионов в среде, где pH поддерживался 50 мМ глициновым буфером, не влияет на рост штаммов Su2, Ki4 и Ki5^T, хотя подвижность клеток значительно снижается.

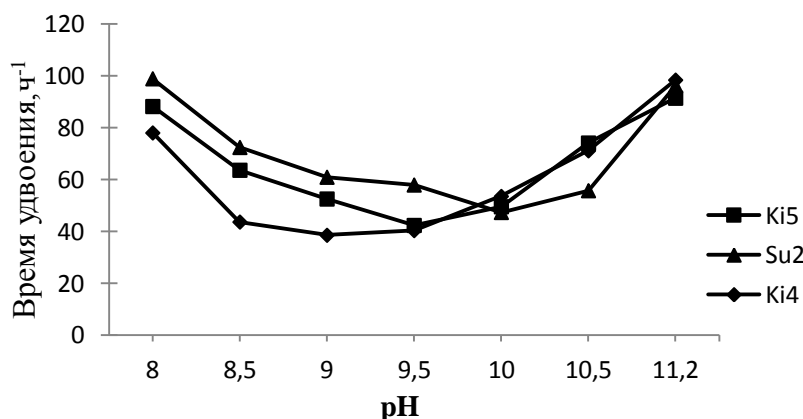


Рисунок 7.
Влияние pH на скорость роста штаммов Ki4, Ki5^T и Su2.

Штаммы Su2, Ki4 и Ki5^T различаются по спектру используемых доноров и акцепторов электронов, но все культуры используют для роста лактат, этанол и сульфат с образованием ацетата и сульфида водорода. Рост на формиате сопровождается образованием только сульфида водорода. Измерение CO₂ как конечного продукта метаболизма при высоких значениях pH невозможно ввиду высокого уровня карбонатов в среде.

Штаммы Ki4 и Ki5^T используют в качестве донора электронов пируват, а штаммы Ki4 и Su2 - молекулярный водород в присутствии ацетата. Штаммы Ki4 и Ki5^T способны также к ферментации лактата в отсутствие источника серы с образованием ацетата, пропионата и валерата, являясь, таким образом, факультативными бродильщиками.

Помимо сульфата как акцептора электронов, штаммы Ki4 и Su2 используют сульфит, штаммы Ki4 и Ki5^T – тиосульфат, штаммы Ki5^T и Su2 – аморфную гидроксид Fe(III). Штамм Ki5^T, кроме того, медленно восстанавливает элементную серу.

В клетках штаммов Ki4, Ki5^T и Su2 обнаружен СО-связывающий цитохром *c* и менахинон МК6(H₂). Десульфовиридин - пигмент характерный для представителей рода *Desulfovibrio* - не обнаружен.

Нами определены нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК и *dsrAB* алкалофильных изолятов. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК показал, что новые штаммы кластеризуются с бактериями рода *Desulfonatronum* (Рисунок 8), а их ближайшим соседом является *D. lacustre* Z-7951^T (99.0, 99.2 и 99.6% сходства для штаммов Ki4, Ki5^T и Su2, соответственно). На дереве бисульфитредуктаз представители рода *Desulfonatronum* также представляют собой довольно тесную группу, но штамм Ki5^T выделился в отдельную ветвь и, вероятно, представляет новый вид рода *Desulfonatronum* (Рисунок 9).

Содержание Г+Ц пар в ДНК штаммов Ki4, Ki5^T и Su2 составляет 56.3, 48.8 и 59.6 мол.%, соответственно. Согласно методу ДНК-ДНК гибридизации, уровень сходства ДНК

штаммов Ki4, Ki5^T и Su2 и типового штамма *D. lacustre* Z-7951^T составил 89, 53 и 79%, соответственно.

Жирнокислотные профили штаммов Ki4, Ki5^T и Su2 показали, что преобладающими жирными кислотами у штамма Ki4 являются C_{14:0}, C_{a15}, C_{16:1ω7c} и C_{18:1ω7}; у штамма Ki5^T – C_{14:0}, C_{a15} и C_{i15}; а у штамма Su2 – C_{14:0}, C_{a15} и C_{16:1ω7c}. Типовой штамм вида *D. lacustre* Z-7951^T отличается от изолятов значительным содержанием жирных кислот C_{18:0} и C_{18:1ω9}.

Выделенные из содовых озер штаммы СВБ, помимо сходства по ряду фенотипических и физиолого-биохимических признаков, имеют и некоторые существенные отличия от типового штамма *D. lacustre* Z-7951^T (Таблица 9). Новые изоляты способны расти на пирувате (штаммы Ki4 и Su2), а также использовать элементную серу (штамм Ki5^T) и аморфную гидроокись Fe(III) (штаммы Ki5^T и Su2) – нехарактерный для алкалофильных сульфатредукторов акцептор электронов. У изученных штаммов СВБ отсутствует облигатная зависимость от карбонат-ионов, характерная для *D. lacustre* Z-7951^T.

Таблица 8. Дифференцирующие признаки штаммов Ki4, Ki5^T, Su2 и *D. lacustre* Z-7951^T

Признак	Ki4	Ki5 ^T	Su2	<i>D. lacustre</i> Z-7951 ^T
Размер, мкм				
ширина	0.6-0.8	0.5-0.7	0.8-0.9	0.7-0.9
длина	2.0-2.5	2.0-2.5	2.3-2.6	2.0-3.0
Жгутики	Перитрих	Монотрих	Монотрих	Монотрих
pH				
пределы	7.5-10.0	7.5-10.5	8.0-11.5	7.0-10.5
оптимум	8.9	9.4	10.0	9.5
Температура, °C				
оптимум	29	34	29	37-40
NaCl, г/л				
пределы	1-80	2-40	2-100	0-100
оптимум	10	5	10	0
Доноры электронов/+SO₄⁻²				
H ₂ + ацетат	+	-	+	+
пируват	+	+	-	-
Акцепторы электронов/+лактат				
сульфит	-	+	+	+
тиосульфат	+	+	-	+
S ⁰	-	+	-	-
Fe ³⁺	-	+	+	-
Ферментация лактата	+	+	-	-
Г+Ц, мол. %	56.3	48.8	59.6	57.3
Авторы описания	Наши исследования	Наши исследования	Наши исследования	Пикута и др., 1998

Учитывая высокое сходство нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, а также высокий уровень сходства ДНК штаммов Ki4 и Su2 с типовым штаммом вида *D. lacustre* Z-7951^T (89 и 79%), мы полагаем, что штаммы Ki4 и Su2 являются новыми штаммами вида *D. lacustre*. При этом штамм Su2 является первым представителем вида *D. lacustre*, способным к восстановлению Fe(III), что расширяет представления о данном виде. Низкий уровень сходства ДНК штамма Ki5^T и *D. lacustre* (53%), а также фенотипические и генотипические характеристики нового штамма свидетельствуют о том, что штамм Ki5^T является представителем нового вида *Desulfonatronum buryatense* sp. nov.

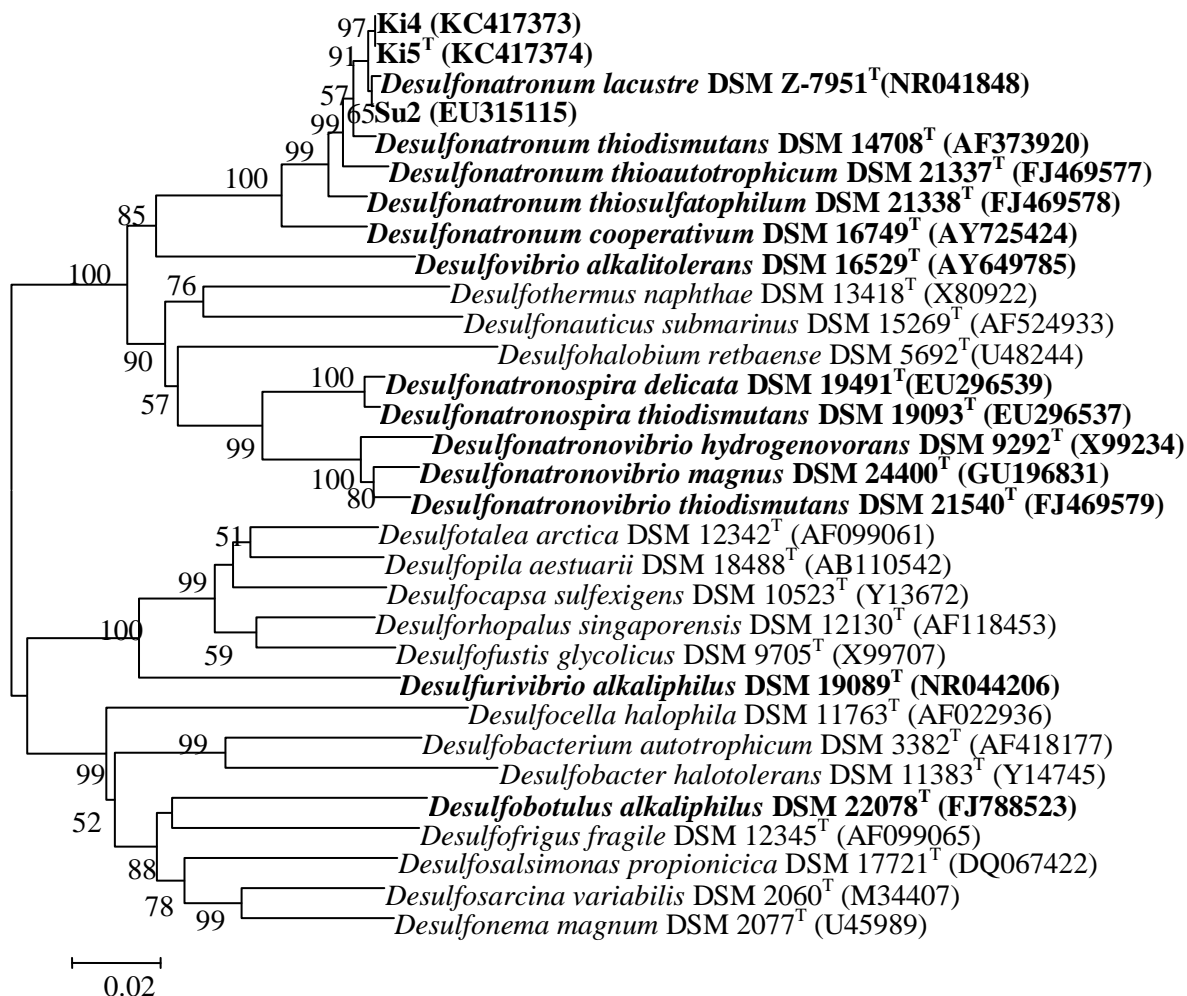


Рисунок 8. Филогенетическое дерево галоалкалофильных СВБ в пределах *Deltaproteobacteria* (СВБ содовых озер выделены жирным шрифтом), построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Длина масштабной линейки: 2 замены на 100 нуклеотидов. Учетный номер базы данных GenBank указан в скобках. Дендрограмма построена с использованием метода поиска ближайших соседей (“neighbour-joining”). Данные “bootstrap”-анализа (выраженные в процентах от 1000 реплик) указаны в точках ветвления.

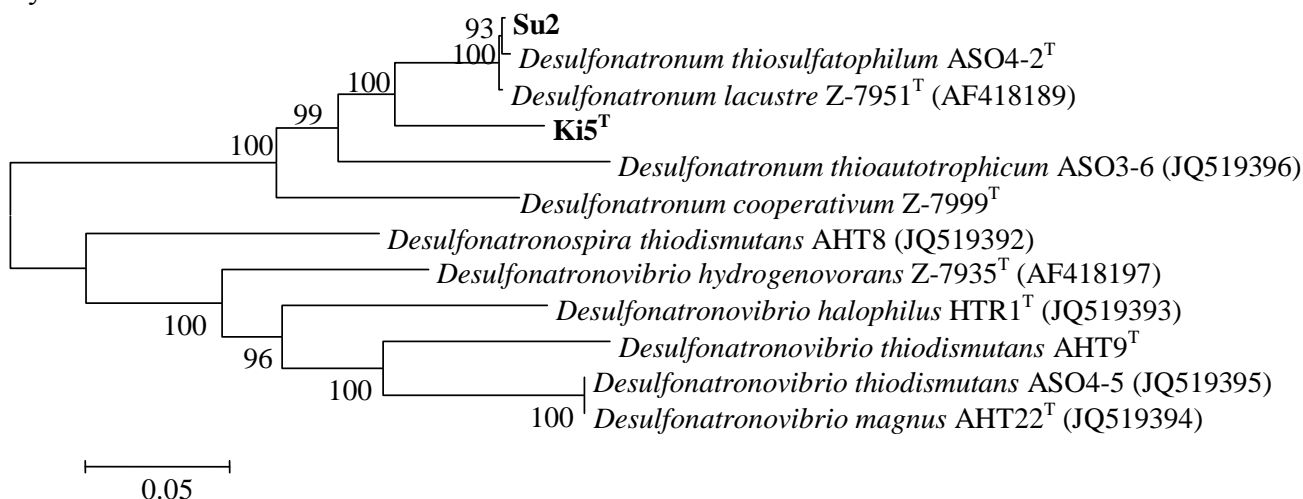


Рисунок 9. Филогенетическое дерево алкалофильных СВБ содовых озер, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена *dsrAB*. Дендрограмма построена с использованием метода поиска ближайших соседей (“neighbour-joining”). Данные “bootstrap”-анализа (выраженные в процентах от 1000 реплик) указаны в точках ветвления.

5.2. Выделение и характеристика анаэробной алкалофильной протеолитической бактерии

В процессе выделения и очистки алкалофильного сульфатредуктора Su2 была обнаружена устойчивая ассоциация этого штамма с палочковидной бактерией. Бактерия-спутник была выделена в чистую культуру и названа штамм Su22^T. Новый изолят представлен неподвижными палочками со слегка заострёнными концами 0.4-0.7×2.0-6.5 мкм (Рисунок 10 а,б), имеет клеточную стенку грамположительного типа, содержащую S-слой (Рисунок 10 б,в). Наличие спор не выявлено, хотя в конце логарифмической фазы роста часто наблюдаются утолщения в центре клетки (Рисунок 10 а). Пастеризация культуры при 80°C в течение 20 минут с последующей инкубацией в оптимальных условиях выявила терморезистентность клеток штамма Su22^T. Анализ ультратонких срезов позволил обнаружить в начинающих лизироваться клетках образования, напоминающие проспоры (Рисунок 10 в). Таким образом, полученные результаты не дают однозначного ответа на вопрос о способности к спорообразованию у новой бактерии.

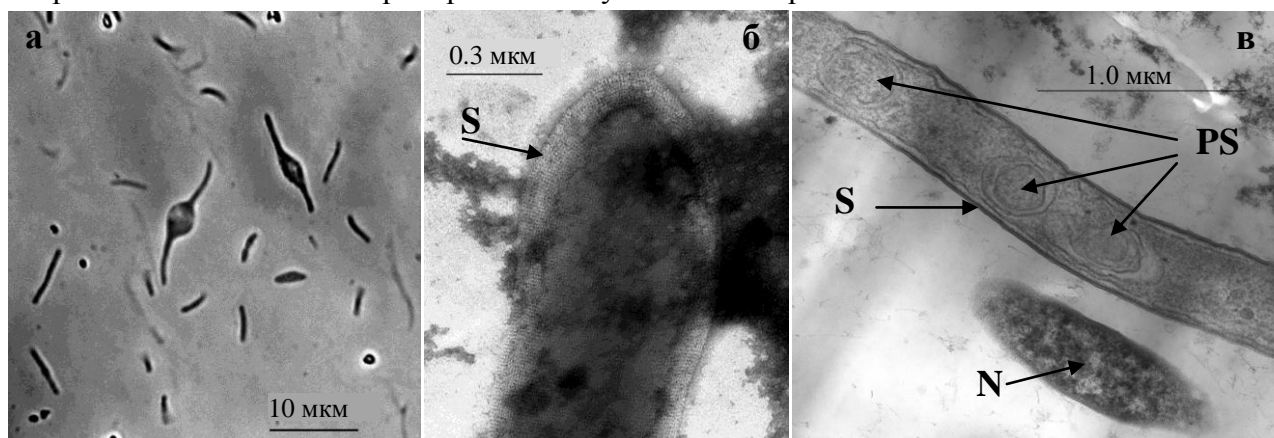


Рисунок 10. Морфология клеток штамма Su22^T. S – S-слой, PS – “проспора”, N – нуклеоид.

Штамм Su22^T не содержит каталазу и является оксидазо-положительной бактерией. Не способен расти в аэробных условиях, однако присутствие $\leq 4.5\%$ O₂ в газовой фазе не ингибирует рост. Изолят является мезофилом и растет в диапазоне температур от 20 до 40°C с оптимумом при 30°C. Изолят является облигатным алкалофилом и способен расти в диапазоне pH 7.4-11.0 с оптимумом роста при pH 9.6 (Рисунок 11 а). Штамм растет в диапазоне NaCl от 2 до 60 г/л, оптимальная концентрация NaCl - 20 г/л (Рисунок 11 б). Рост изолята зависит от присутствия карбонатов-ионов, их замена на глициновый буфер ингибирует рост во втором пересеве.

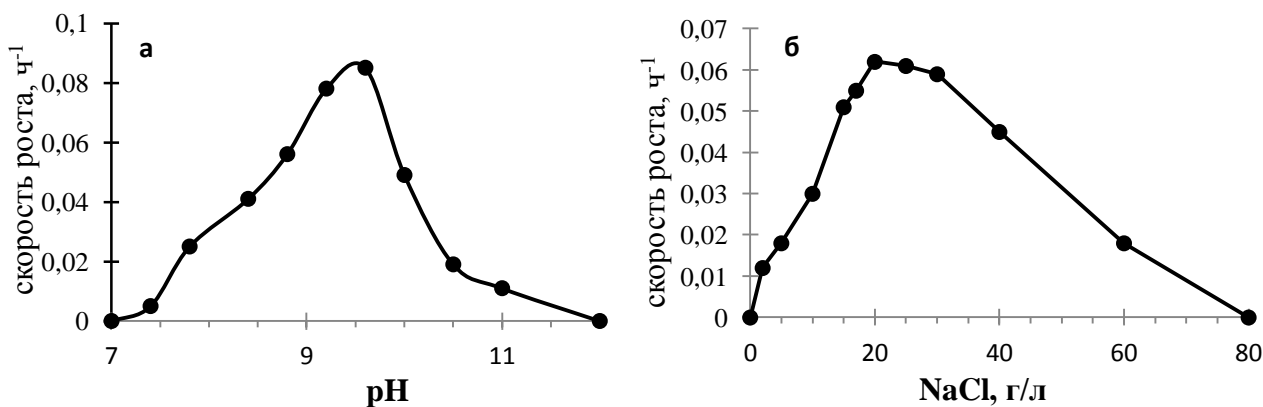


Рисунок 11. Влияние pH (а) и NaCl (б) на рост штамма Su22^T.

В качестве источника углерода и энергии штамм Su22^T использует дрожжевой экстракт, триптон, казеин и разрушенную биомассу сульфатредуктора штамм Su2. Пируват, пептон, глюкоза, фруктоза, триптиказа, фумарат, манноза, лактат, формиат, бутират, пропионат, гептоноат, капроат, малат, сукцинат, сорбит, цитрат, метанол, бутанол, индивидуальные аминокислоты и их пары не поддерживают рост изолята. Все потребности штамма в макро- и микроэлементах могут удовлетворяться средой, содержащей только карбонаты, NaCl и дрожжевой экстракт, причем выход биомассы пропорционален концентрации дрожжевого экстракта. Витамины (Wolin et al., 1963) не заменяют дрожжевой экстракт.

Штамм Su22^T не зависит от присутствия в среде акцепторов электронов. Тем не менее, добавление в среду серосодержащих акцепторов электронов стимулирует рост изолята. Рост штамма Su22^T в присутствии тиосульфата и элементарной серы сопровождается образованием сульфида (1.98 и 3.2 мМ, соответственно).

При росте на дрожжевом экстракте (2 г/л) штамм Su22^T образует аммоний, формиат, ацетат и пропионат, не выделяет водород и этанол. Таким образом, физиологически штамм Su22^T относится к первичным анаэробам, использующим белковые соединения для роста.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК показал, что штамм Su22^T образует отдельную ветвь с *A. sibiricum* Z-7981^T – единственным видом рода *Anoxynatronum* – со сходством 98.1%. Дендрограмма на Рисунке 12 демонстрирует положение штамма Su22^T среди представителей второго кластера семейства *Clostridiaceae*, в основном относящихся к алкалофильным протеолитическим и сахаролитическим бактериям содовых озер.

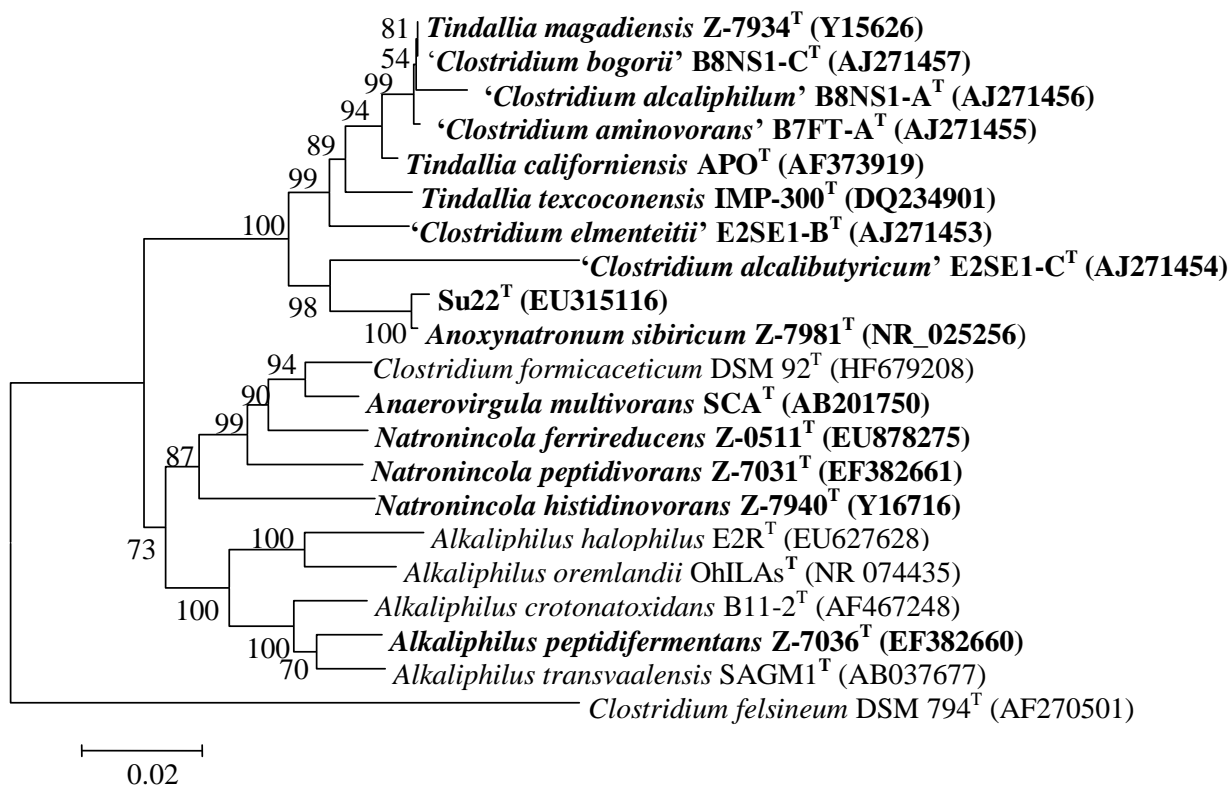


Рисунок 12. Филогенетическое древо второго кластера семейства *Clostridiaceae*, построенное на основе анализа гена 16S рНК. Бактерии, выделенные из содовых озер, показаны жирным шрифтом. Дендрограмма построена с использованием метода поиска ближайших соседей (“neighbour-joining”). Данные “bootstrap”-анализа (выраженные в процентах от 1000 реплик) указаны в точках ветвления.

Сравнение профилей жирных кислот штаммов Su22^T и *A. sibiricum* Z-7981^T показало, что доминирующими жирными кислотами являются C_{16:1ω7c}, C_{16:0} и C_{16:0a}. В сумме они составляют 54.34% от общего количества ЖК для штамма Su22^T, и 42.51% для *A. sibiricum* Z-7981^T. Однако по составу минорных компонентов профили значительно различаются. Так, клетки штамма Su22^T содержат жирные кислоты C_{12:0} и C_{17:1ω9}, а клетки штамма Z-7981^T – C_{13:0}, C_{14:1ω5}, C₁₅, C₁₅, C_{16:1} OMe, C_{18:0a}, C₁₇, C₁₇, C₁₇сус, C_{19:0}, C_{18:0} 10-охо и C_{18:0} 10-ОН.

Содержание Г+Ц пар в ДНК штамма Su22^T составляет 46.1 мол %. Уровень сходства ДНК штамма Su22^T и *A. sibiricum* Z-7981^T составляет 69%.

Выделенная из содового озера новая протеолитическая бактерия Su22^T имеет значительные отличия по ряду фенотипических и генотипических свойств от типового штамма вида *A. sibiricum* Z-7981^T, являющегося сахаролитической бактерией (Таблица 9). В отличие от *A. sibiricum* Z-7981^T, штамм Su22^T не сбраживает сахара, пептон, и не растет на отдельных аминокислотах. Кроме тиосульфата, он восстанавливает элементную серу при росте на дрожжевом экстракте.

Таким образом, полученные фенотипические и генотипические характеристики новой бактерии убедительно свидетельствуют в пользу того, что она является представителем нового вида рода *Anoxyratronum*, для которого предложено название '*Anoxyratronum buryatense*' sp. nov.

Таблица 9. Дифференцирующие характеристики штаммов Su22^T и *A. sibiricum* Z-7981^T

Признак	Su22 ^T	<i>A. sibiricum</i> Z-7981 ^T
Размер, мкм		
ширина	0.4-0.7	0.5-0.7
длина	2.0-6.5	3.8-5.0
Подвижность	–	+
Каталаза	–	+
pH		
пределы	7.4-11.0	7.1-10.1
оптимум	9.5	9.1
Температура, °C		
диапазон	20-40	25-41
оптимум	30	35
NaCl, г/л		
пределы	2-60	2-40
оптимум	20	10-20
Доноры электронов:		
углеводы	–	+
пируват	–	+
глутамат	–	+
цистеин	–	+
хитин	–	+
казеин	+	н.д.
Акцепторы электронов:		
S°	+	–
Г+Ц, мол. %	46.1	48.4
Авторы описания	Наши исследования	Garnova et al., 2003

6. Восстановление Fe(III) сульфатвосстанавливающими бактериями в щелочных условиях

Большинство железоредуцирующих бактерий являются нейтрофилами. До недавнего времени восстановление аморфного и слабокристаллического оксида железа в содовых озерах считалось невозможным из-за низкой доступности Fe(III) при щелочной реакции среды (Ye et al., 2004). Однако, некоторые алкалофильные бактерии, выделенные из содовых озер, восстанавливают как растворимые, так и плохо растворимые соединения железа (Zavarzina et al., 2006; Zhilina et al., 2009 a,b).

Нами впервые выделены два штамма СВБ (штамм Ki5^T и Su2), способные использовать аморфную гидроокись Fe(III) как акцептор электронов во время роста при pH 9.5-10.0. Восстановление аморфного гидроксида Fe(III) сопровождалось образованием 3.54 (Su2) и 3.12 (Ki5^T) молей Fe(II) на 1 моль потребленного лактата в третьем пересеве. Как показано для штамма Su2 (Рисунок 13), процесс восстановления железа сопровождается потреблением лактата, накоплением ацетата и увеличением численности клеток от единичных до 10⁸ кл/мл. Таким образом, это первое описание алкалофильной железоредукции, осуществляемой СВБ. Экологическую роль данного феномена в содовых озерах следует изучить более детально. Возможно, способность к железоредукции генетически закрепилась у сульфатвосстанавливающих бактерий содовых озер во времена доминирования на Земле цикла железа, что придало им метаболическую гибкость и позволило адаптироваться к окружающей среде при подавленном цикле серы.

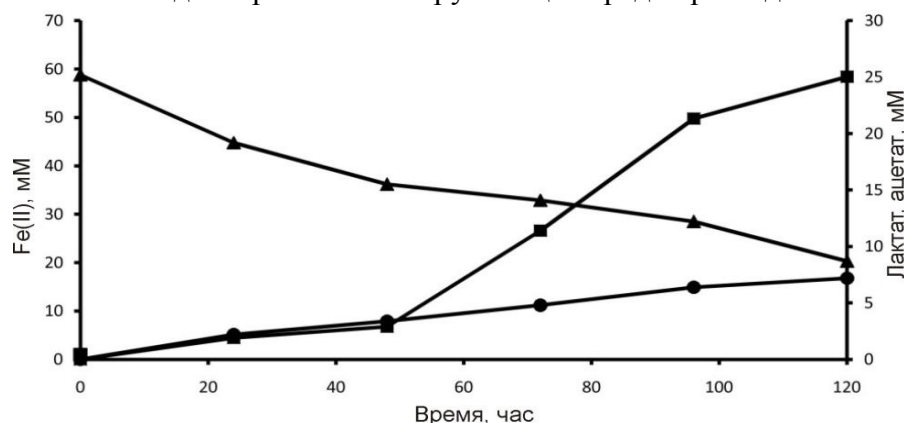


Рисунок 13. Образование ионов двухвалентного железа и ацетата при окислении лактата штаммом Su2. Условные обозначения: (▲) – лактат; (●) – ацетат; (■) – Fe(II).

7. Новые виды анаэробных бактерий

Диагноз *Desulfovibrio algoritolerans* sp. nov.

Desulfovibrio algoritolerans [al.go.ri'to'le.rans. L. masc. n.algor -oris, холод, холодный; N.L. neut. adj. algoritolerance, L. pres. part. tolerans толерантный; N.L. part. adj. algoritolerans холодоустойчивый].

Клетки представлены грамтрицательными неспоровыми подвижными одиночными вибрионами размером 0.5×2.0 мкм. Движение осуществляется за счет двух монополярных очехленных жгутиков. Размножение клеток происходит бинарным делением. Строгий анаэроб. Каталазо-отрицательная бактерия. Использует лактат, формиат, водород, этанол, фумарат, аланин и пируват в качестве доноров электронов в присутствии сульфата. Использует сульфат, сульфит, тиосульфат, элементную серу, Fe(III) цитрат и Fe(III) ЭДТА как акцептор электронов в присутствии лактата. Психротолерантная бактерия, растет в диапазоне температур от -2 до 36°C (оптимум 26°C). Нейтрофил, растет при pH 6.8-7.4 (оптимум 7.0-7.2). Умеренный галофил, растет в диапазоне NaCl от 5 до 40 г/л (оптимум 20 г/л). Облигатно зависит от ионов Na⁺. Содержание Г+Ц в ДНК 42.3 мол %.

Типовой штамм K3S^T (=VKM В-2877^T=DSM 100341^T) выделен из арктического криопэга (полуостров Ямал, Россия). Номер нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК в GenBank KJ739728.

Диагноз *Desulfonatronum buryatense* sp.nov.

Desulfonatronum buryatense [bu.ry.at.en'se NL. neut. adj. buryatense, регион выделения Бурятия].

Клетки представлены грамотрицательными неспоровыми подвижными вибрионами размером 0.5-0.7×2.0-2.5 мкм с одним полярным жгутиком. Клетки встречаются одиночно или образуют короткие спирали. Размножение клеток происходит бинарным делением. Строгий анаэроб. Каталазо-отрицательная бактерия. Использует лактат, формиат, этанол и пируват как донор электронов и источник углерода в присутствии сульфата. Использует сульфат, сульфит, тиосульфат, аморфную гидроокись Fe(III) и элементную серу как акцептор электронов в присутствии лактата. Способен к сбразиванию лактата в отсутствии сульфата.

Мезофил, растет в диапазоне температур от 20 до 40°C (оптимум 34°C). Облигатный алкалофил, растет при pH 7.5-10.5 (оптимум 9.4). Умеренный галофил, растет в диапазоне NaCl от 2 до 40 г/л (оптимум 5 г/л). Облигатно зависит от ионов Na⁺, зависимость от карбонатных ионов не обнаружена. Доминирующие жирные кислоты (>10%) C_{14:0} и C_{а15}. Содержит менахинон МК-6(H₂). Содержание Г+Ц в ДНК 48.8 мол. %.

Типовой штамм Ki5^T (=VKM В-2477^T=DSM 26308^T) выделен из донных осадков содового озера Соленое (Кяхтинский район, Бурятия, Россия). Номер нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК в GenBank KC417373.

Диагноз *Anoxynatronum buryatense* sp.nov.

Anoxynatronum buryatense [bu.ry.at.en'se NL. neut. adj. buryatense, регион выделения Бурятия].

Клетки представлены неподвижными палочками со слегка заостренными концами размером 0.4-0.7×2.0-6.5 мкм. Размножение клеток происходит бинарным делением. Клеточная стенка грамположительного типа, содержит S-слой. Каталазо-отрицательная и оксидазо-положительная бактерия. Аэротолерантна, присутствие ≤ 4.5% O₂ в газовой фазе не ингибирует рост. Осуществляет ферментативный метаболизм. В качестве источника углерода использует дрожжевой экстракт, триптон, казеин и разрушенную микробную биомассу. Не утилизирует сахара, пептон, пируват, фумарат, лактат, формиат, глутамат, пропионат, хитин, цитрат, метанол, бутанол, индивидуальные аминокислоты или пары аминокислот. Способен восстанавливать элементную серу и тиосульфат с образованием сульфида. При росте на дрожжевом экстракте образует аммоний, формиат, ацетат и пропионат.

Мезофил, растет в диапазоне температур 20-40°C (оптимум 30°C). Облигатный алкалофил, растет в диапазоне pH 7.4-11.0 (оптимум 9.6). Умеренный галофил, растет в диапазоне NaCl от 2 до 60 г/л (оптимум 20 г/л). Доминирующие жирные кислоты (>10%) C_{16:1ω7c}, C_{а16:0}, C_{16:0}. Содержание Г+Ц в ДНК 46.1 мол. %.

Типовой штамм Su22^T (=VKM В-2510^T = СЕСТ 8731^T) выделен из донных отложений содового озера Сульфатное (Селенгинский район, Бурятия, Россия). Номер нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК в GenBank EU315116.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сульфатвосстанавливающие бактерии являются важным звеном микробных сообществ современных осадков Мирового океана, а также наземных экосистем, характеризующихся высокими концентрациями сульфатов. Диссимиляционное восстановление сульфатов в процессах образования минералов - широко известный биогеохимический процесс, в результате которого сера выводится из ее глобального круговорота.

Нами впервые проведена оценка численности СВБ с помощью ПЦР-РВ в двух экстремальных экосистемах – в криопэгах полуострова Ямал и донных осадках содовых озер Соленое и Сульфатное. Численность сульфатредукторов составила 7.9×10^4 - 2.4×10^6 копий гена *dsrA*/г в донных осадках содовых озер, и 2.7×10^2 - 6.9×10^3 копий гена *dsrAB*/мл в криопэгах. Представители рода *Desulfonatronum* присутствовали во всех исследованных образцах донных отложений содовых озер и составили 6.5-75% от общей численности СВБ.

Донные осадки содовых озер Соленое и Сульфатное стали источником выделения трех штаммов галоалкалофильных сульфатредукторов. Применение методов полифазной таксономии убедительно показало, что один из выделенных штаммов (*Ki5^T*) представляет новый вид *Desulfonatronum buryatense* sp. nov. и является первой СВБ, способной к восстановлению Fe(III) в щелочных условиях. Новое свойство для представителей алкалофильных сульфатредукторов – способность использовать трехвалентное железо в качестве акцептора электронов – экспериментально подтверждено и для нового представителя вида *D. lacustre* - штамма Su2.

Новая протеолитическая бактерия '*Anoxynatronum buryatense*' Su22^T характеризуется способностью к росту на клетках сульфатредуктора, выделенного из этого же места обитания, что определяет экофизиологическую роль нового вида как поставщика аминокислот, ацетата и формиата в трофическую цепь алкалофильных микробных сообществ содовых озер.

Из арктического криопэга выделен новый психротолерантный галофильный сульфатредуктор, являющийся представителем нового вида '*Desulfovibrio algoritolerans*' sp. nov. и характеризующийся способностью восстанавливать Fe(III) и расти при отрицательных температурах.

Новый психротолерантный изолят может представлять интерес как источник холодоактивных ферментов, а также как компонент искусственно создаваемых сообществ, способных к биодegradации загрязняющих природу веществ в холодном климате. Галоалкалофильные штаммы *D. buryatense* *Ki5^T* и '*A. buryatense*' Su22^T также могут найти применение в биоремедиации окружающей среды, удаляя тяжелые металлы и соединения серы из сточных вод с высокими значениями рН и солености. Наличие S-слоя у штамма Su22^T открывает перспективы его исследования и определения возможности применения в бионанотехнологии: в нанолитографии, а также для создания ультрафильтрующих мембран.

Таким образом, сочетание микробиологических и молекулярно-биологических методов позволило не только оценить численность сульфатредукторов в исследованных эконисах, но и получить новые данные о видовом разнообразии и метаболическом потенциале СВБ содовых озер и криопэгов. Выделены новые представители родов *Desulfonatronum*, *Desulfovibrio* и *Anoxynatronum* обладающие уникальными свойствами. Дальнейшее изучение этих свойств, расшифровка геномов новых бактерий и их анализ позволит оценить общие для прокариот и специфические для этих бактерий механизмы адаптации к соответствующим условиям среды.

ВЫВОДЫ:

1. Впервые проведена оценка численности сульфатвосстанавливающих бактерий в донных осадках содовых озер Соленое и Сульфатное (Южная Бурятия) и криопэгах полуострова Ямал методом ПЦР “в реальном времени”. Численность СВБ в донных осадках содовых озер составила 7.9×10^4 - 2.4×10^6 копий гена *dsrA*/г, в криопэгах – 2.7×10^2 - 6.9×10^3 копий гена *dsrAB*/мл.
2. Применение разработанных праймеров на ген 16S рРНК рода *Desulfonatronum* позволило оценить распространение и численность СВБ этого рода в природных образцах содовых озер, составившую 6.5-75% от общего числа СВБ.
3. Психротолерантный галофильный сульфатредуктор, выделенный из арктического криопэга, является представителем нового вида ‘*Desulfovibrio algoritholerans*’ sp. nov. (K3S^T=ВКМ В-2877^T= DSM 100341^T) и характеризуется способностью восстанавливать Fe(III) и расти при отрицательных температурах.
4. Из донных осадков содовых озер выделены и охарактеризованы 4 новых штамма галоалкалофильных анаэробных бактерий, относящихся к родам *Desulfonatronum* (штаммы Ki4, Ki5^T и Su2) и *Anoxynatronum* (Su22^T). Штамм Ki5^T (=ВКМ В-2477^T=DSM 26308^T) является представителем нового вида *Desulfonatronum buryatense* sp. nov. Протеолитическая бактерия штамм Su22^T представляет собой новый вид ‘*Anoxynatronum buryatense*’ sp. nov. (=ВКМ В-2510^T=СЕСТ 8731^T).
5. Впервые обнаружена способность использовать Fe(III) в качестве акцептора электронов в условиях высокой щелочности среды (рН 9.5-10.0) представителями алкалофильных сульфатредукторов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Рыжманова Я.В., Вайнштейн М.Б., Щербакова В.А. Анаэробные бактерии содовых озер Южного Забайкалья // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2011. № 4/1 (38). с. 86.
2. Ryzhmanova Y., Nepomnyashchaya Y., Abashina T., Ariskina E., Troshina O., Vainshtein M., Shcherbakova V. New sulfate-reducing bacteria isolated from Buryatian alkaline brackish lakes: description of *Desulfonatronum buryatense* sp. nov. // Extremophiles, 2013. V.17. p. 851–859.

Тезисы:

1. Рыжманова Я.В., Лауринавичюс К.С. Применение ПЦР “в реальном времени” для определения состава анаэробных микробных сообществ в толщах многолетнемерзлых отложений // Сборник тезисов 13-й международной Пуцинской школы-конференции молодых ученых “Биология - наука XXI века”. Пушино, 2009. с. 209.
2. Рыжманова Я.В., Лауринавичюс К.С. Анализ анаэробных микробных сообществ в толщах многолетнемерзлых отложений методом ПЦР “в реальном времени” // Сборник тезисов всероссийского симпозиума с международным участием “Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов”, Москва, МГУ им. М.В.Ломоносова, 2009. с. 159.
3. Ryzhmanova Y., Troshina O., Laurinavichius K., Rivkina E., Shcherbakova V. Development and application of a real-time PCR method for characterization of permafrost anaerobic microbial communities // 10th European Workshop on Astrobiology EANA, Institute of Physico-Chemical and Biological Problems of Soil Science, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia, 2010. p. 29.
4. Рыжманова Я.В., Ошуркова В.И., Лауринавичюс К.С., Щербакова В.А. Анаэробные бактерии-спутники из умеренно минерализованного содового озера Сульфатное, Южная Бурятия // Сборник тезисов 17-й международной Пуцинской школы-конференции молодых ученых “Биология - наука XXI века”. Пушино, 2013. с. 43.
5. Ryzhmanova Y., Shcherbakova V., Troshina O. Diversity of sulfate-reducing bacteria of Buryatian alkalinity-brackish lakes // The 5th FEMS Congress of European Microbiologists, Leipzig, 2013.
6. Ryzhmanova Y., Shcherbakova V. Molecular detection of the sulfate-reducing bacteria in extreme ecosystems and isolation of a new psychrotolerant sulfate-reducing bacterium from Arctic cryopeg // 10-й международный конгресс “Extremophiles”, Санкт-Петербург, Россия, 2014.