

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА**

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

НЕПОМНЯЦАЯ ЯНА НИКОЛАЕВНА

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В
ТЕРМОФИЛЬНЫХ ЖЕЛЕЗОВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ
СООБЩЕСТВАХ**

Специальность 03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2010 г.

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: доктор биологических наук, проф.
Александр Иванович Нетрусов

Научный консультант: доктор биологических наук
Александр Игоревич Слободкин

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Алла Николаевна Ножевникова

кандидат биологических наук
Ирина Васильевна Ботвинко

Ведущая организация: Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов имени Г.К. Скрабина РАН,
Пушино, Московская область

Защита состоится «23» ноября 2010 года в 15 ч. 30 мин. на заседании
диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном
университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские
горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета
МГУ.

Автореферат разослан «__» октября 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Н.Ф. Пискунова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Железо – четвертый по распространенности химический элемент земной коры. Микробное восстановление Fe(III) является основным путем окисления органического вещества в некоторых пресноводных, морских и почвенных природных экосистемах (Lovley, 1991; Thamdrup, 2000). Термофильные железовосстанавливающие микроорганизмы являются компонентом микробных сообществ термальных экосистем, которые представляют большой интерес для исследования и рассматриваются как аналоги древнейшей биосферы. Процессы, протекающие в них, могут моделировать древнейшие биоценозы (Заварзин, 2001; Stetter, 2006). Термофильные прокариоты, способные восстанавливать Fe(III), могли играть существенную роль в ранней биосфере Земли, вероятно, характеризовавшейся повышенными температурами и высоким содержанием соединений железа (Lovley, 2004; Слободкин, 2005), восстановление Fe(III) микроорганизмами, вероятно, служило первым и основным окислителем органического углерода (Walker, 1987) и могло быть первым возникшим типом метаболизма (Lovley, 2005). Микробная железоредукция оказывает влияние на хозяйственную деятельность человека, участвуя в процессах биокоррозии металлов, оглеение почв, удаление органических загрязнителей, восстановлении токсичных и радиоактивных химических элементов [As(V), Cr(VI), V(V), Tc(VII), U(VI)] с образованием малорастворимых соединений, что может быть использовано при разработке технологий биоремедиации. Минералы, формирующиеся при микробном восстановлении металлов, могут найти применение в современных нанотехнологиях, а также как носители в высокочувствительных методах анализа (Lee and Newman, 2003; Lovley et al., 2004; Chernykh et al., 2007).

Процессы биогенного восстановления Fe(III) включают в себя энзиматические и биотически опосредованные реакции, и осуществляется микроорганизмами из разных филогенетических групп прокариотных доменов: *Bacteria* и *Archaea*. Термофильные железоредукторы не представляют собой единой филогенетической группы и к настоящему времени включают в себя представителей более двадцати родов бактерий и шести родов архей (Слободкин, 2005). Для восстановления нерастворимых оксидов Fe(III) в нейтральных средах обитания железоредукторы используют разные физиологические стратегии и биохимические механизмы (Stams et al., 2006; Gralnick and Newman, 2007; Lovley, 2008). Исследования структуры термофильных микробных сообществ, восстанавливающих нерастворимые оксиды Fe(III) в условиях свободного и ограниченного контакта клеток с минералом, важно для расширения знаний о таксономическом и физиологическом разнообразии железоредукторов, понимания взаимодействия клеток и акцептора в природных экосистемах и характеристики таксономических групп прокариот в конкретных физиологических условиях. Детальное исследование физиологических возможностей восстановления оксидов Fe(III) проводилось на представителях мезофильных бактерий родов *Shewanella* и *Geobacter* (Reguera et al., 2005; Gorby et al., 2006). Сведения о стратегиях восстановления оксидов Fe(III) у термофильных микроорганизмов

ограничены исследованиями гипертермофильных архей рода *Pyrobaculum* (Feinberg et al., 2008). Информация о физиологических механизмах восстановления нерастворимых соединений трёхвалентного железа у термофильных бактерий отсутствует. Большинство предыдущих исследований термофильных железовосстанавливающих прокариот базировалось на таксономическом описании отдельных видов бактерий и архей. Изучение филогенетического состава термофильных микробных сообществ, восстанавливающих оксид Fe(III) в условиях свободного и ограниченного контакта клеток с минералом до представленного исследования не проводили.

В связи с вышеизложенным, исследования филогенетического разнообразия микроорганизмов в термофильных железовосстанавливающих сообществах представляет научный и практический интерес.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось изучение филогенетического разнообразия микроорганизмов в термофильных анаэробных сообществах участвующих в процессах микробного восстановления минералов Fe(III).

В задачи входило:

Исследовать филогенетический состав прокариот в термофильных накопительных культурах, способных восстанавливать нерастворимый слабокристаллический оксид Fe(III) используя различные физиологические стратегии.

Выделить чистые культуры термофильных микроорганизмов, способных участвовать в восстановлении соединений Fe(III) и исследовать их фенотипические и генотипические свойства.

Охарактеризовать филогенетические группы термофильных прокариот, входящих в состав железовосстанавливающих микробных сообществ, представители которых до настоящего времени не поддавались культивированию.

Научная новизна работы. Впервые проведен филогенетический анализ термофильных железовосстанавливающих микробных сообществ развивающихся при наличии и отсутствии прямого контакта клеток прокариот со слабокристаллическим оксидом Fe(III).

Выделен и охарактеризован новый таксон термофильной бактерии *Moorella humiferrea*, sp. nov. (DSM 23265^T, ВКМ В-2603^T) Для нового изолята показана способность восстанавливать нерастворимый оксид Fe(III) с помощью растворимых веществ переносчиков, в частности гуминовых кислот, и установлены минимальные концентрации этих веществ, при которых протекает процесс микробной железоредукции.

В составе железовосстанавливающих микробных сообществ, молекулярными методами выявлены микроорганизмы относящиеся к филогенетическому типу *Planctomycetes*, анаэробные термофильные представители которого до настоящего времени не поддавались культивированию. Впервые получены устойчивые накопительные культуры термофильных анаэробных планктомицетов. Определены температурные

границы и концентрации кислорода, допустимые для роста представителей *Planctomycetes*.

Полученные результаты расширяют представления о микробном разнообразии термофильных анаэробных железобактериальных сообществ, о функциональных взаимодействиях и физиологических механизмах восстановления нерастворимых минералов Fe(III) микроорганизмами в термальных местах обитания. Данные исследования могут послужить основой для разработки методов выделения чистых культур относящихся к новым таксонам прокариот.

Практическое значение. Исследуемые микробные сообщества выделены из уникальных природных экосистем, требующих бережного отношения. Полученные данные являются необходимой базой для дальнейших исследований этих экосистем, а также будут необходимы при выработке эффективных мер по сохранению этих природных объектов от загрязнения. Прокариоты способные к железоредукции и адаптированные к высоким температурам представляют интерес как компоненты искусственно создаваемых сообществ, способных к биодegradации загрязняющих природу веществ в теплом климате, а также как источники термостабильных ферментов, используемых в пищевой промышленности, при очистке сточных вод, в молекулярной биологии.

Апробация работы. Основные положения работы доложены на XVI, XVII Международных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва 2009, 2010), Международной конференции по биологии термофильных микроорганизмов «Thermophiles 2009» (Пекин, 2009), V Молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2009), Международном конгрессе «Extremophiles 2010» (Понта-Делгада, 2010), а также на ежегодных аттестациях научных работ кафедры микробиологии, МГУ имени М.В. Ломоносова (2009, 2010).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 138 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 194 ссылки, содержит 7 таблиц и 31 рисунок.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научным руководителю д.б.н., проф. А.И. Нетрусову и консультанту д.б.н. А.И. Слободкину за внимание, помощь при проведении работы, в интерпретации полученных результатов и подготовке рукописи диссертационной работы. Искреннюю признательность автор приносит всем сотрудникам лаборатории гипертермофильных микробных сообществ за предоставление технической базы, помощь в освоении методик, содействие в процессе работы и дружескую поддержку. Особо автор благодарит к.б.н. Г.Б. Слободкину за помощь в

освоении методик, постановке и проведении эксперимента и обработке полученных результатов. Автор выражает глубокую признательность сотрудникам д.б.н. С.Н. Дедыш (ИНМИ РАН), Н.А. Кострикиной (ИНМИ РАН), к.б.н. Н.А. Черных (ИНМИ РАН), к.б.н. Т.В. Колгановой (Центр «Биоинженерия» РАН), д.б.н. Т.Г. Юдиной (МГУ) за помощь на отдельных этапах работы. Автор искренне благодарит д.б.н. В.В. Алешина (Институт физико-химической биологии МГУ им. Белозерского) за помощь в проведении филогенетического анализа, ценные советы и доброе отношение. Выражаю признательность к.б.н. В.А. Щербаковой (ИБФМ РАН) за ценные советы и поддержку. Выражаю искреннюю благодарность семье и друзьям за дружескую поддержку.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили образцы воды и осадка из семи наземных гидротерм кальдеры Узон и Долины Гейзеров (Камчатка), отобранные в ходе экспедиции в сентябре 2008 (табл. 1).

Таблица 1. Характеристики природных образцов наземных гидротерм Камчатки, использованных для получения накопительных культур термофильных железовосстанавливающих микроорганизмов.

Обозначение	Место отбора	Описание пробы	T, °C	pH
1814	Узон, Оранжевое поле	Чёрный крупнозернистый осадок из небольшого источника	76-80	6,6
1823	Узон, Восточное поле	Серо-чёрный осадок из ист. Трещинный	74-85	6,5
1835	Узон, руч. Извилистый	Серый осадок из горячего источника в ложе ручья с отложениями серы и железа по краям	77-86	6,2-6,5
1850	Узон, Восточное поле	Чёрный осадок из небольшого источника с белыми нитчатыми обрастаниями	78	6,2
1860	Узон, оз. Фумарольное	Бурый глинистый осадок из мелководного источника у края озера	84	6,8
1861	Узон, участок Тростниковый	Чёрный осадок из источника с охристыми отложениями	60	6,2
1864	Долина Гейзеров, горячий ручей из гейзера Грот	Чёрный осадок из горячего ручья с бурым дном и высшей растительностью по краям	78	7,7

Температура и pH в месте отбора пробы. pH измерен при температуре пробы.

Состав сред и условия культивирования. Для получения и культивирования накопительных и чистых культур термофильных железовосстанавливающих анаэробных микроорганизмов использовали

слабоминерализованную среду, описанную ранее (Slobodkin et al., 1997), содержащую 0,2 г/л дрожжевого экстракта в качестве фактора роста. Газовая фаза CO₂ (100%). pH среды 6,8–7,0 (20°C). В качестве донора электронов вносили ацетат (9 мМ) или лактат (14 мМ). Акцептором электронов служил слабокристаллический оксид железа(III) (минерал ферригидрит), либо суспендированный в среде [свободный ферригидрит, (конечная концентрация Fe(III) в среде - 90 мМ), либо заключенный в гранулы альгината кальция (конечная концентрация Fe(III) в среде - 70 мМ)]. В качестве экзогенного медиатора железоредукции добавляли 9,10-антрахинон-2,6-дисульфонат (АХДС) в количестве 0,1 мМ. Свободный ферригидрит, гранулы альгината с ферригидритом и без последнего получали по методикам описанным ранее (Slobodkin et al., 1997; Nevin et al., 2000). Приготовление сред и культивирование накопительных культур производили с использованием техники культивирования анаэробных микроорганизмов Хангейта (Hungate, 1969).

Изучение морфологии клеток, контроль чистоты культур и оценку роста микроорганизмов проводили прямым микроскопированием (световой микроскоп Микмед 1, ЛОМО, с фазово-контрастным устройством).

Электронно-микроскопические исследования*. Препараты ультратонких срезов для электронно-микроскопических исследований готовили по Рейнольдсу (Reynolds, 1963). Для изучения культур микроорганизмов в сканирующем микроскопе фиксацию проводили 2,5%-ным глутаровым альдегидом. Напыление образцов проводили платиной на приборе фирмы LKB, Швеция. Форму и поверхность исследуемого материала изучали с помощью микроскопов «Amray» (США) и «CamScan» (Великобритания) при ускоряющем напряжении 20 kV.

*За проведение электронно-микроскопических исследований автор благодарит к.б.н. Н.А. Кострикину (ИНМИ РАН) и д.б.н. Т.Г. Юдину (МГУ им. М.В.Ломоносова).

Культуральные свойства и физиологические особенности чистой культуры нового изолята изучали по общепринятым методикам (Powell, 1983; Герхард и др., 1984; Boone and Whitman, 1988).

Аналитические методы. Определение летучих жирных кислот и спиртов в продуктах метаболизма определяли по методикам, описанным ранее (Слободкин и др., 1995). Молекулярный водород определяли газохроматографически на хроматографе Chrom 5 (Чехия), детектор – катарометер, газ-носитель – азот, подвижная фаза – активированный уголь марки АГЗ, минимальный порог чувствительности по водороду – $2 \cdot 10^{-5}$ об.%. Концентрацию образующегося Fe(II) измеряли спектрофотометрически с 2,2-дипиридилем (Резников и др., 1970). Нерастворимые формы железа растворяли в оксалатном буфере, как описано ранее (Гаврилов и др., 2003). Определение концентрации H₂S проводили колориметрическим методом (Truper and Schlegel, 1964).

Выделение ДНК и определение нуклеотидного состава. ДНК из накопительных культур выделяли и очищали методом Мармура с некоторыми модификациями (Park, 2007). Фрагменты генов 16S рРНК были получены путем прямой амплификации геномной ДНК согласно известному протоколу ПЦР-амплификации для получения фрагментов ДНК с дальнейшим анализом методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ, Muyizer et al., 1993). Использовали универсальный праймер Uni515F (Lane, 1991), содержащий CG-clamp на 5'-конце (Muyizer et al., 1993) в паре с *Bacteria*-специфичным праймером Bac-907R (Muyizer et al., 1995) или *Archaea*-специфичным праймером Arch-915R (Casamayor et al., 2002). Полученные продукты амплификации разделяли с помощью ДГГЭ, проводимому согласно протоколу (Muyizer et al., 1997) с денатурирующим градиентом от 35% до 65%, (где 100% денатурант содержал 7М мочевину и 40% формамид). Фрагменты ДНК из индивидуальных полос, полученных в ходе ДГГЭ, были перенесены в 20 мкл стерильной воды путем пассивной диффузии ДНК из геля в течение ночи при 4°C. Нуклеотидные последовательности ДНК из индивидуальных полос определяли методом ферментативного секвенирования на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems DNA Sequencer 373A, используя стандартный протокол и набор реактивов ("Fluorescent dye Cycle Sequencing kit", "Perkin-Elmer", США). Полученные спектрограммы нуклеотидных последовательностей были отредактированы вручную при помощи программы BioEdit и депонированы в GenBank под номерами HM003692-HM003777.

Филогенетический анализ. Идентификацию нуклеотидных последовательностей с последовательностями генов 16S рРНК, содержащимися в базе данных GenBank NCBI проводили при помощи программы BLAST (Altschul et al., 1990). Последовательности, имеющие 100%-ную идентичность фрагментов рибосомальных генов друг с другом включены в анализ и представлены на дереве одним организмом. Нуклеотидные последовательности выравнивали в автоматическом режиме с помощью программы CLUSTALW (Thompson et al., 1994) и корректировали вручную. Построение бескорневых филогенетических деревьев производили с использованием Neighbour-Joining алгоритма в программе MEGA 4,0 (Tamura et al., 2007). В качестве внешней группы была взята последовательность *Thermococcus celer*, с регистрационным номером в GenBank - AY099174. Для оценки устойчивости топологии полученных деревьев применяли метод bootstrap (1000 альтернативных деревьев). На дендрограммах представлены значения выше 60%.

Определение Г+Ц состава ДНК* проводили по методу Герхарда, основанному на анализе кривых температур плавления ДНК (Герхардт и др., 1984).

*За определение Г+Ц состава ДНК автор благодарит к.б.н. Н.А. Черных (ИНМИ РАН)

Флуоресцентная *in situ* гибридизация*. Детекцию планктомицетов осуществляли путем гибридизации фиксированных образцов накопительных культур с эквимольярной смесью 16S рРНК-специфичного зонда PLA886, меченого флуоресцентным красителем Cy3, разработанного для целей

определения представителей филогенетической группы *Planctomycetes* (Neef et al., 1998). Гибридизацию и окрашивание препаратов ДНК-специфичным флуоресцентным красителем – ДАФИ (4',6'-диамидино-2-фенилиндол) проводили согласно методике описанной ранее (Панкратов и др., 2005). Препараты анализировали с использованием эпифлуоресцентного микроскопа Zeiss Axio Imager D1 (Zeiss, Йена, Германия).

*За любезно предоставленный зонд автор благодарит д.б.н. С.Н. Дедыш (ИНМИ РАН)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Получение железовосстанавливающих накопительных культур.

Для получения накопительных культур анаэробных термофильных железовосстанавливающих микроорганизмов использовали семь проб осадка и воды, отобранных из наземных гидротерм Камчатки (см. табл. 1). В целях исследования физиологических механизмов восстановления Fe(III) использовали три варианта среды, имитирующие возможные взаимодействия микроорганизмов и оксида Fe(III): (1) среда со свободным ферригидритом – возможность прямого контакта клеток с минералом; (2) среда с ферригидритом, включённым в гранулы альгината – отсутствие прямого контакта клеток с минералом; (3) среда с ферригидритом, включённым в гранулы альгината, и добавлением 0,1 мМ 9,10-антрахинон-2,6-дисульфоната (АХДС) – при отсутствии прямого контакта клеток с минералом между ними возможен перенос электронов за счёт экзогенного растворимого медиатора. АХДС – растворимый медиатор железоредукции, способный переносить электроны от клеток микроорганизмов к поверхности нерастворимого акцептора электронов по циклическому механизму за счёт многократных процессов окисления-восстановления (Lovley et al., 1996). В качестве потенциальных доноров электронов для восстановления Fe(III) нами были выбраны ацетат – один из важнейших метаболитов анаэробного разложения органического вещества, и лактат – распространённый продукт брожения термофильных микроорганизмов. Температуры, выбранные для инкубирования (60, 65 и 80°C), были близки к температурам в местах отбора проб.

Общее количество начальных накопительных культур составило 54. После 3 последовательных 5% (об.) пересевов было получено 30 накопительных культур термофильных микроорганизмов (Табл. 2).

В накопительных культурах со свободным ферригидритом образовавшийся чёрный осадок обладал магнитными свойствами. Измерение конечной концентрации Fe(II) после 7-30 суток инкубирования показало наибольшее количество Fe(II) в накопительных культурах со свободным ферригидритом. Накопительных культур, способных к восстановлению такого же количества Fe(III) за счёт образования эндогенных медиаторов, получить не удалось. При отсутствии прямого контакта клеток с ферригидритом, добавление АХДС значительно стимулировало железоредукцию.

2. Филогенетический анализ биоразнообразия накопительных культур термофильных железовосстанавливающих микробных сообществ

Общая характеристика филогенетического состава накопительных культур. Из 22 накопительных культур железовосстанавливающих микробных сообществ была выделена тотальная ДНК, с помощью таксон-специфичных праймеров к доменам *Bacteria* и *Archaea* амплифицированы фрагменты генов 16S рРНК, проведено их разделение методом ДГГЭ и определены нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК индивидуальных полос.

Таблица 2. Восстановление ферригидрита железовосстанавливающими накопительными культурами термофильных микроорганизмов из гидротерм Камчатки

Образец (см. табл. 1)	Т инкуба ции, °С	Fe(II), ммоль/л*					
		Условия культивирования					
		Свободный ферригидрит		Ферригидрит, включённый в гранулы альгината		Ферригидрит, включённый в гранулы альгината, + АХДС	
		Ацетат	Лактат	Ацетат	Лактат	Ацетат	Лактат
1814	65	20,3	11,0	6,4	4,9	14,9	23,2
	80	-**	-	-	-	-	-
1823	80	-	-	-	-	-	-
1835	80	-	-	-	-	-	-
1850	65	28,0	14,0	3,6	1,8	20,9	22,0
	80	-	-	-	-	5,0	6,4
1860	80	25,6	24,7	-	-	2,4	3,5
1861	60	30,0	30,0	10,5	4,3	11,6	18,2
1864	65	30,0	30,0	2,5	4,2	6,8	15,6

*Конечная максимальная концентрация образовавшегося Fe(II) через 7-30 дней инкубации

** - железоредукции не отмечено, концентрация Fe(II) менее 0,1 ммоль/л

Общее количество полученных индивидуальных полос составило 110. После анализа нуклеотидного состава соответствующих полос, нуклеотидные последовательности, имеющие сходство 100% и полученные из одной накопительной культуры, рассматриваются нами как идентичные и относящиеся к одному организму. Для дальнейшего анализа 86 полученных нуклеотидных последовательностей были разделены на три группы. (1) Филотипы, нуклеотидные последовательности которых имеют сходство не ниже 94% с сиквенсами представителей известных культивируемых родов микроорганизмов, и рассматриваемые нами как члены этого рода. Критерий сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК в 93-94% является граничным в современной практике описания новых родов прокариот. (2) Филотипы, имеющие сходство нуклеотидных последовательностей на уровне 90-92% с культивируемыми микроорганизмами. (3) Филотипы, нуклеотидные последовательности которых имеют сходство с сиквенсами культивируемых

микроорганизмов менее 90%, и чьими ближайшими родственниками являются некультивируемые микроорганизмы. Проведённый филогенетический анализ показал, что большинство полученных сиквенсов принадлежат представителям прокариот родственным к термофильным анаэробным бактериям. 65 обнаруженных флотипа могут быть отнесены к 23 родам выделенных и описанных прокариот. Для 21 флотипа наиболее близкородственными являются некультивируемые микроорганизмы. Большинство обнаруженных флотипов бактерий принадлежит к филогенетическому типу *Firmicutes* (58 сиквенсов, 72%). Также были найдены представители следующих филогенетических типов (в скобках указано количество детектированных сиквенсов): *Actinobacteria* (2), *Aquificae* (1), *Bacteroidetes* (2), *Nitrospirae* (1), *Planctomycetes* (3), *Proteobacteria* (1), *Spirochaetes* (1), *Synergistetes* (2), *Thermotogae* (10). Наиболее часто встречаются сиквенсы представителей родов бактерий *Carboxydotherrnus* (7) и *Thermoanaerobacter* (7). Археи были представлены 5 сиквенсами представителей родов *Pyrobaculum*, *Desulfurococcus* и *Thermofilum* (все тип *Crenarchaeota*). Виды, способные к железоредукции, известны среди родов бактерий *Carboxydotherrnus*, *Carboxydocella*, *Thermincola*, *Thermoanaerobacter*, *Thermolithobacter*, *Thermosinus*, *Thermotoga*, *Thermovenabulum* и археи *Pyrobaculum*. Количество сиквенсов, относящихся к этим родам, составляет 54% от общего числа полученных сиквенсов.

Различия филогенетического состава при наличии и отсутствии контакта с минералом. Количество детектированных флотипов в накопительных культурах с разными возможностями контакта клеток с минералом составило: свободный ферригидрит – 22 (рис. 2, 3); ферригидрит в гранулах альгината – 32 (рис. 4, 5); ферригидрит в гранулах альгината + АХДС – 32 (рис. 6, 7). При свободном доступе к ферригидриту большинство детектированных микроорганизмов составляют представители родов, для которых показана способность к железоредукции. При отсутствии прямого контакта детектируются как известные железоредукторы, так и организмы, для которых способность к восстановлению Fe(III) неизвестна. Наиболее часто в накопительных культурах как при наличии, так и в отсутствие контакта с ферригидритом детектируются представители родов *Carboxydotherrnus*, *Thermoanaerobacter* и *Thermotoga*, которые, очевидно, обладают наиболее эффективными механизмами железоредукции в диапазоне температур 60-70°C. Вероятно, реализация той или иной стратегии железоредукции является специфическим свойством для вида или штамма, а не для всех представителей рода в целом. Именно члены родов *Carboxydotherrnus* и *Thermoanaerobacter* были первыми описанными железоредукторами из наземных гидротерм (Slobodkin et al., 1997; 1999).

Необходимо отметить, что в средах, содержащих альгинат и АХДС, создаются потенциальные условия для развития микроорганизмов, способных использовать эти вещества в качестве донора или акцептора электронов, т.е. количество экологических ниш в этих условиях выше, чем в среде со свободным ферригидритом. Кроме того, гранулы альгината могут способствовать развитию биоплёнок и стимулировать рост микроорганизмов, требующих прикрепления к поверхности твёрдого субстрата.

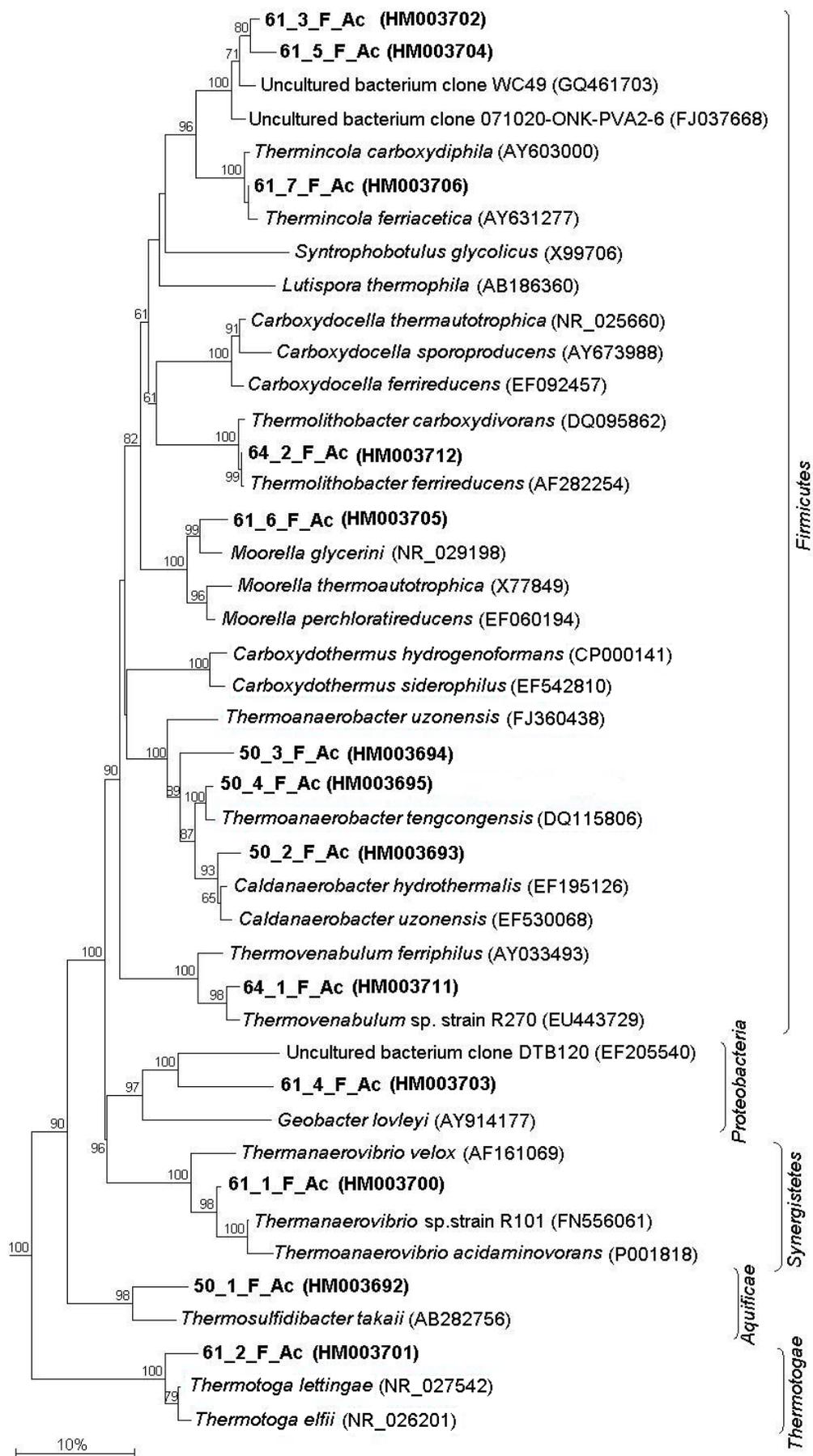


Рисунок 2. Филогенетическая дендограмма построенная на основе сравнения генов 16S рРНК бактерий для накопительных культур с суспендированным в среде ферригидритом и ацетатом (филотипы, полученные в данном исследовании, выделены жирным шрифтом, номера GenBank представлены). Масштабная линейка – 10% различия последовательностей.

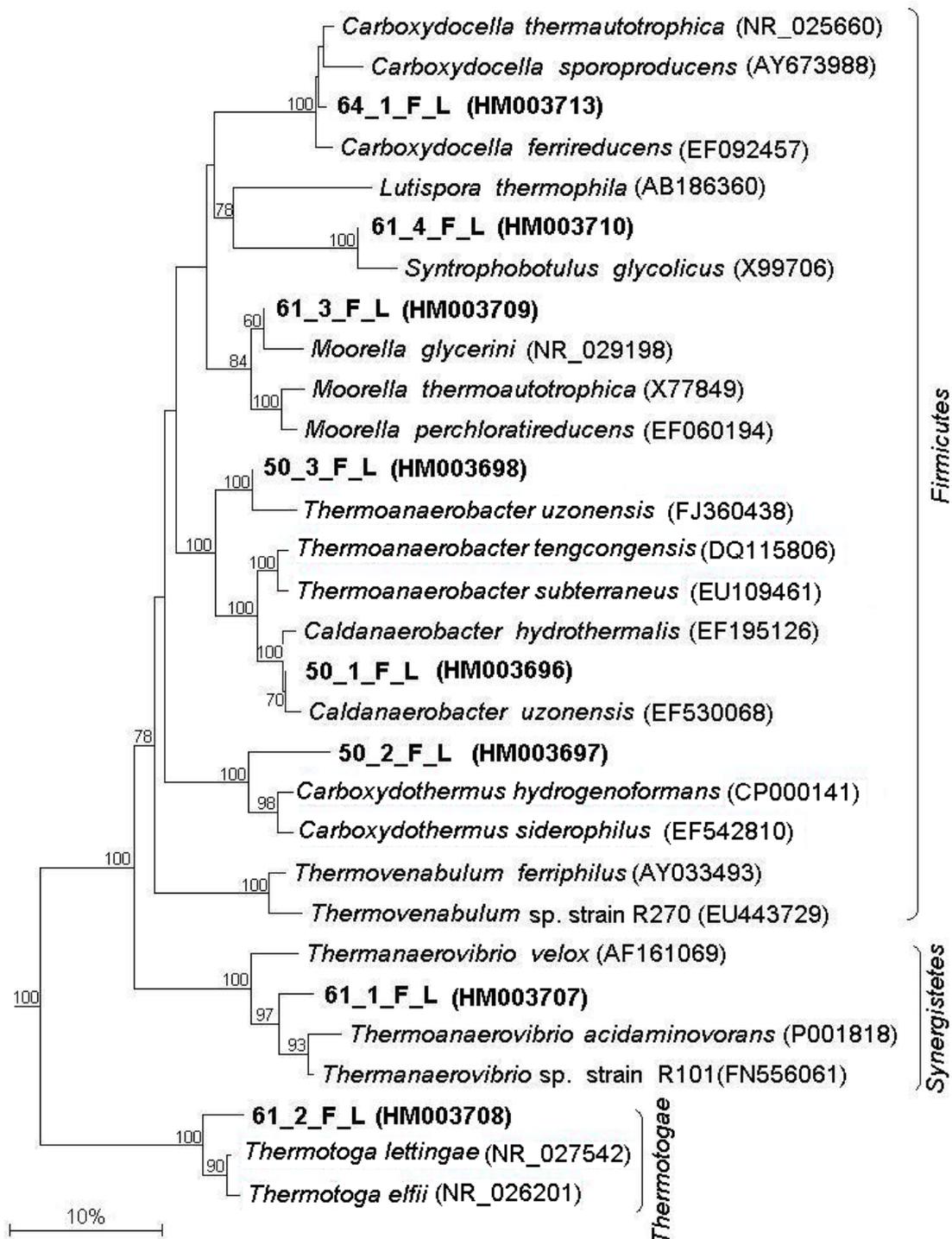


Рисунок 3. Филогенетическая дендограмма построенная на основе сравнения генов 16S рРНК бактерий для накопительных культур с суспендированным в среде ферригидритом и лактатом (филотипы, полученные в данном исследовании, выделены жирным шрифтом, номера GenBank представлены). Масштабная линейка – 10% различия последовательностей.

В присутствии альгината и Fe(III) в устойчивых накопительных культурах в большом количестве обнаружены микроорганизмы, имеющие лишь отдалённое родство с известными культивируемыми видами. Полученные результаты могут послужить основой для разработки методов выделения чистых культур, относящихся к новым таксонам.

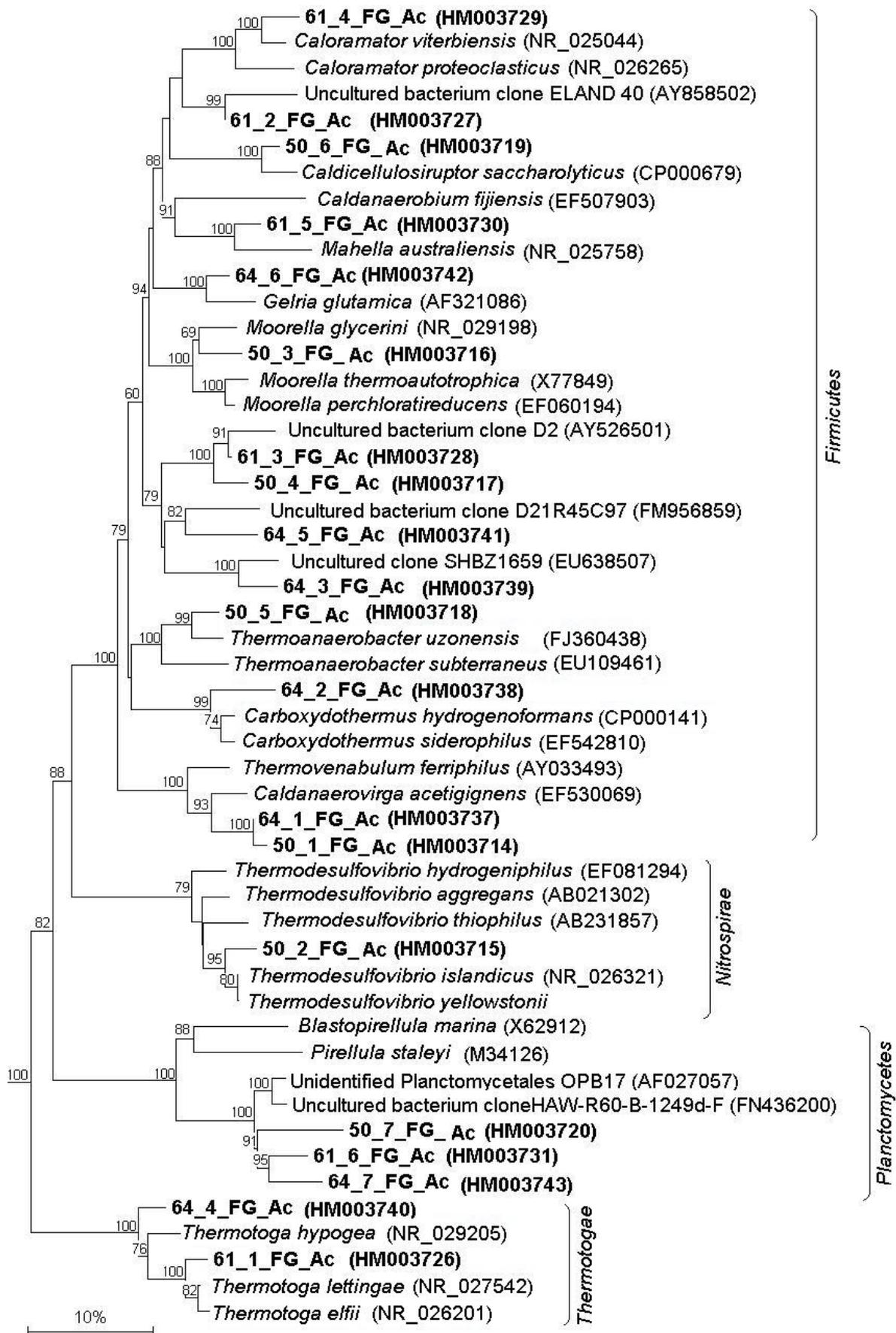


Рисунок 4. Филогенетическая дендограмма построенная на основе сравнения генов 16S рНК бактерий для накопительных культур с ферригидритом, заключенным в гранулы альгината, и ацетатом (филотипы, полученные в данном исследовании, выделены жирным шрифтом, номера GenBank представлены).. Масштабная линейка – 10% различия последовательностей.

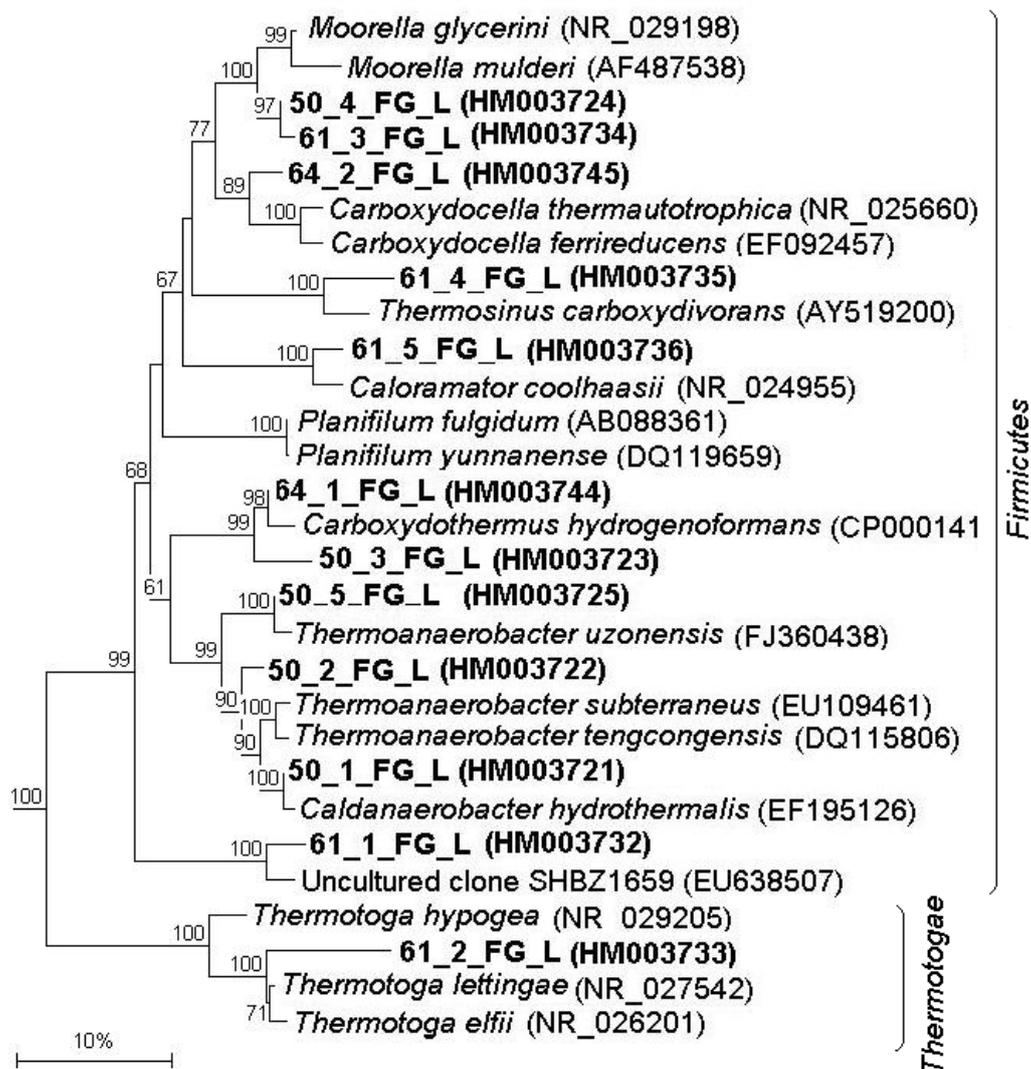


Рисунок 5. Филогенетическая дендограмма построенная на основе сравнения генов 16S рРНК бактерий для накопительных культур с ферригидритом, заключенным в гранулы альгината, и лактатом (филотипы, полученные в данном исследовании, выделены жирным шрифтом, номера GenBank представлены). Масштабная линейка – 10% различия последовательностей.

Различия филогенетического состава в зависимости от донора электронов.

Количество филотипов, в исследуемых накопительных культурах, составило 58 сиквенсов для сообществ использующих ацетат и 28 сиквенсов для сообществ использующих лактат в качестве потенциальных доноров электронов для железоредукции (см. рис. 1-7). В накопительных культурах с ацетатом присутствует значительно больше представителей некультивируемых прокариот, чем на среде с лактатом (19 и 2). Теоретически, лактат является более энергетически выгодным субстратом, который может сбрасываться даже в отсутствие внешнего акцептора электронов. Очевидно, в природных микробных сообществах, использованных для получения накопительных культур, ацетат служит более важным интермедиатом разложения органического вещества и к его использованию способно большее количество микроорганизмов.

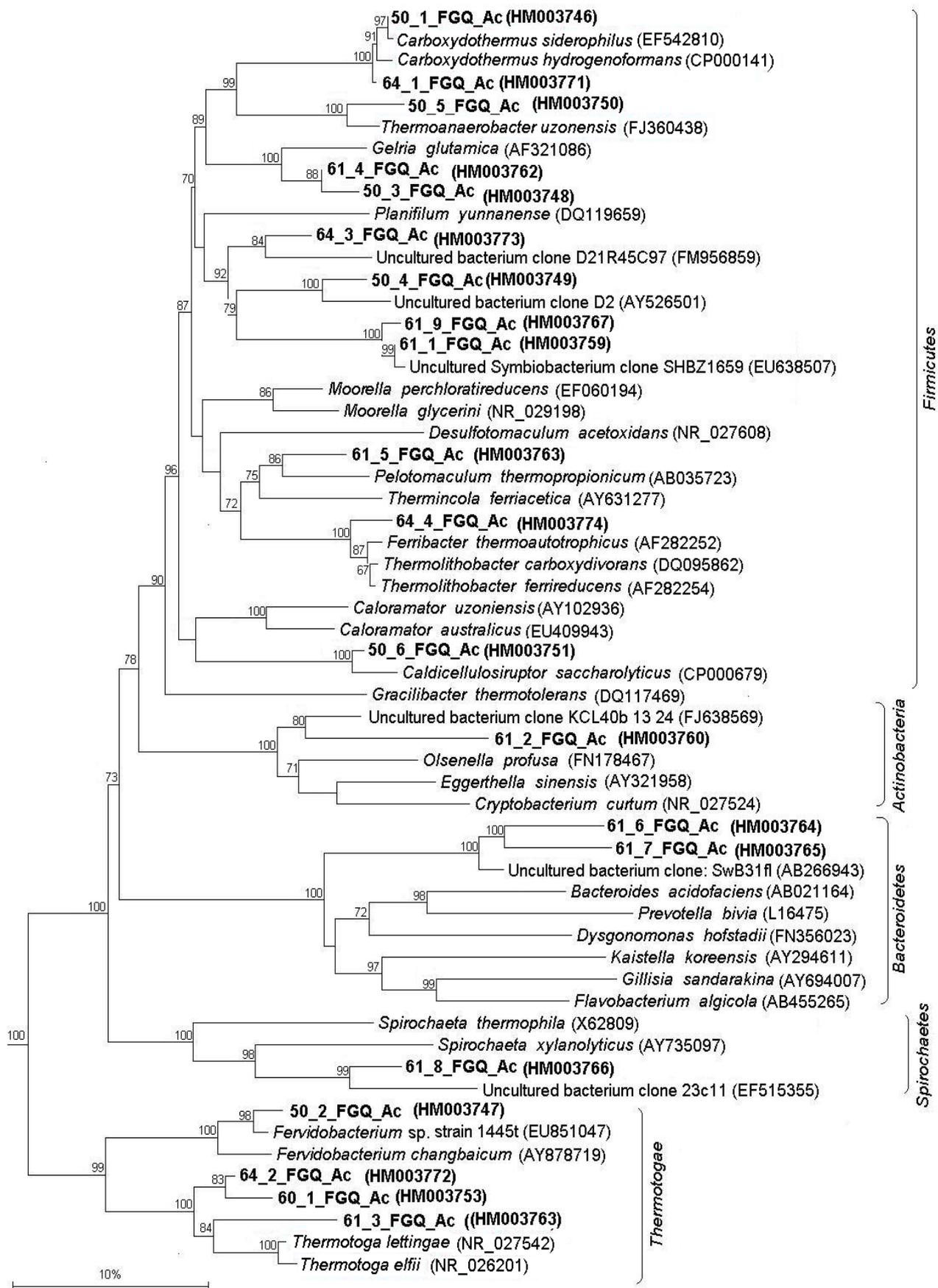


Рисунок 6. Филогенетическая дендограмма построенная на основе сравнения генов 16S рРНК бактерий для накопительных культур с ферригидритом, заключенным в гранулы альгината, и АХДС, с ацетатом в качестве донора электронов (филотипы, полученные в данном исследовании, выделены жирным шрифтом, номера GenBank представлены). Масштабная линейка – 10% различия последовательностей.

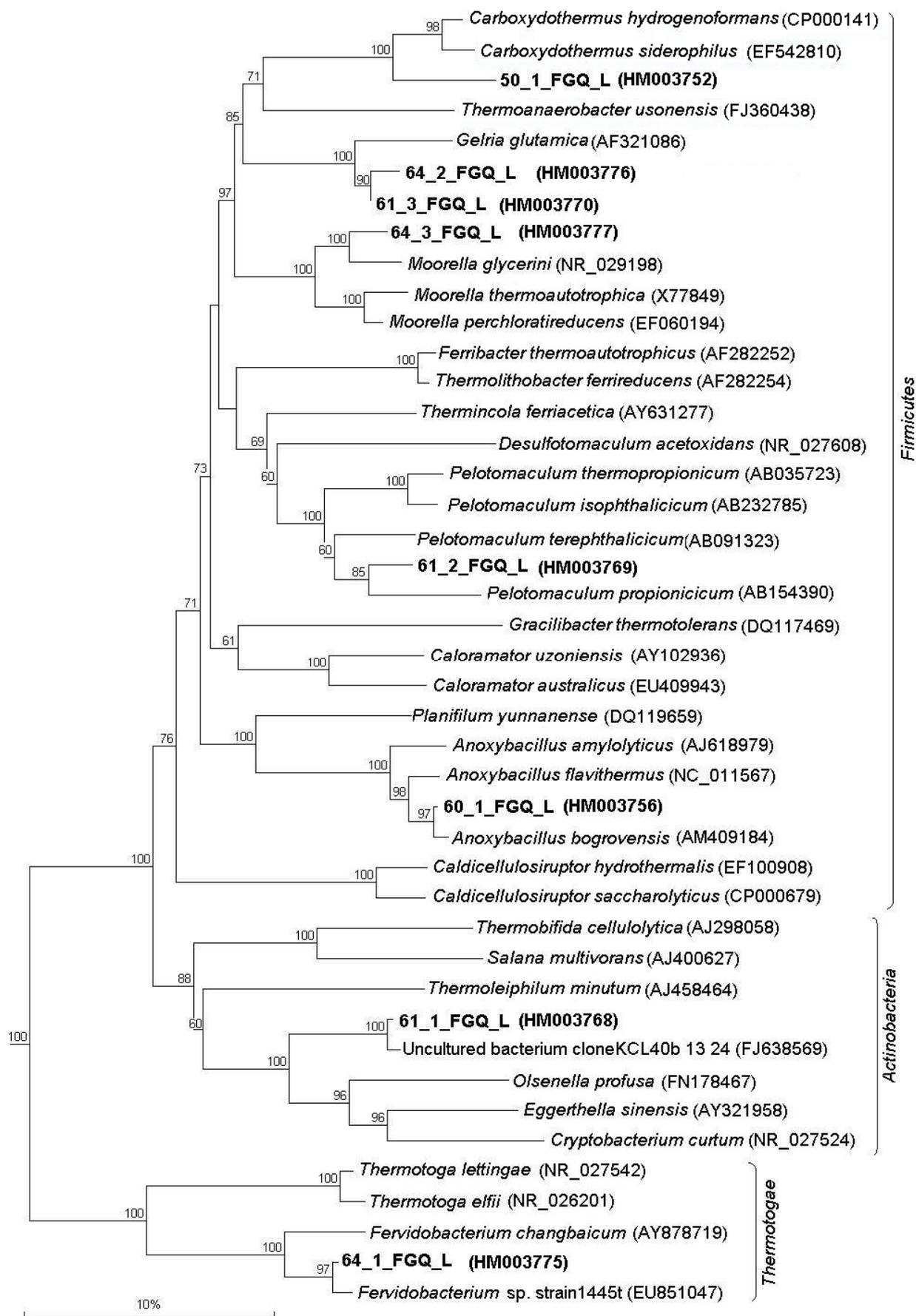


Рисунок 7. Филогенетическая дендограмма построенная на основе сравнения генов 16S рНК бактерий для накопительных культур с ферригидритом, заключенным в гранулы альгината, и АХДС, с лактатом в качестве донора электронов (филотипы, полученные в данном исследовании, выделены жирным шрифтом, номера Genbank представлены). Масштабная линейка – 10% различия последовательностей.

3. Новые анаэробные термофильные бактерии, полученные из накопительных культур термофильных железовосстанавливающих микроорганизмов

3.1. Общая характеристика штамма новой термофильной ацетогенной бактерии

Выделение. Из накопительной культуры 64_FGQ_L железовосстанавливающего микробного сообщества, полученной инокулированием образца осадка и воды наземной гидротермы Долины Гейзеров был выделен новый изолят. Новый штамм был назван 64_FGQ^T.

Морфология клеток. Клетки штамма 64_FGQ^T представляли собой прямые или изогнутые, в стационарной фазе роста, палочки размером 0,3-0,5×2,0-5,0 мкм. Исследование ультратонких срезов показало наличие клеточной стенки грамположительного типа. В стационарной фазе роста наблюдали терминальные эндоспоры с булавовидным спорангием. Деление клеток происходило образованием поперечной перетяжки.

Параметры роста изолята. Штамм 64_FGQ^T рос в диапазоне температур от 46 до 70°C, рост не наблюдали при температурах культивирования 37 и 75°C. Время удвоения клеток штамма 64_FGQ^T в среде с лактатом и АХДС при температуре 65°C составляло 2 ч. 6 мин. Рост штамма 64_FGQ^T наблюдали при рН от 5,5 до 8,5. Оптимум рН лежал в диапазоне значений нейтральной среды от 6,5 до 7,0. При оптимальных температуре и значении рН среды рост штамма 64_FGQ^T наблюдали при концентрации до 15 г/л NaCl, с оптимумом от 0 до 5 г/л NaCl.

В присутствии АХДС (20мМ) в качестве акцептора электронов штамм 64_FGQ^T окислял глицерин, дрожжевой экстракт, лактат, пептон и пируват. В отсутствие акцепторов электронов штамм 64_FGQ^T был способен сбрасывать галактозу, фруктозу, мальтозу, сахарозу, пептон и пируват. Следующие субстраты были проверены, но не поддерживали рост штамма 64_FGQ^T в присутствии или отсутствии АХДС: формиат, ацетат, пропионат, бутират, оксалат, малат, фумарат, метанол, этанол, пропанол, бутанол, бензоат, ацетон, глицин, валин, аланин, глюкоза, манноза, целлобиоза, фильтровальная бумага, альгинат, крахмал и оливковое масло. Штамм 64_FGQ^T в отличие от типовых штаммов рода *Moorella* не использовал молекулярный водород в качестве донора электронов с АХДС или ферригидритом и 0,1 мМ АХДС, и был не способен к хемолитоавтотрофному росту в присутствии H₂/CO₂ (80:20 об/об). Рост штамма 64_FGQ^T облигатно зависел от присутствия в среде дрожжевого экстракта (минимальная концентрация необходимая для роста составляла 0,05 г/л).

В качестве конечных акцепторов электронов с лактатом в качестве донора электронов, штамм 64_FGQ^T восстанавливал следующие неорганические соединения: АХДС, гуминовые кислоты, нитрат, перхлорат, тиосульфат. Продуктом восстановления тиосульфата был сероводород, нитрата – аммоний, перхлората – хлорид. Штамм 64_FGQ^T не восстанавливал Fe(III)-ЭДТА, цитрат Fe(III), MnO₂, фумарат, сульфат, сульфит, серу и кислород в среде с лактатом или глицерином в качестве доноров электронов.

Восстановление ферригидрита штаммом 64_FGQ^T. В условиях культивирования штамма 64_FGQ^T с ферригидритом, суспендированным в среде или заключенным в гранулы альгината, рост и восстановление Fe(III) возможны в присутствии низких концентраций в среде растворимых веществ переносчиков электронов. Гуминовые кислоты стимулировали рост и образование Fe(II) клетками штамма 64_FGQ^T в концентрациях 0,25 и 0,5 г/л. Дальнейшее увеличение концентрации гуминовых кислот не влияло на рост и восстановление железа исследуемой культурой. Добавление АХДС стимулировало рост и образование Fe(II) штаммом в диапазоне концентраций АХДС от 0,01 до 0,2 мМ. Дальнейшее увеличение количества АХДС до 1 мМ не влияло на рост и железоредукцию (рис. 8).

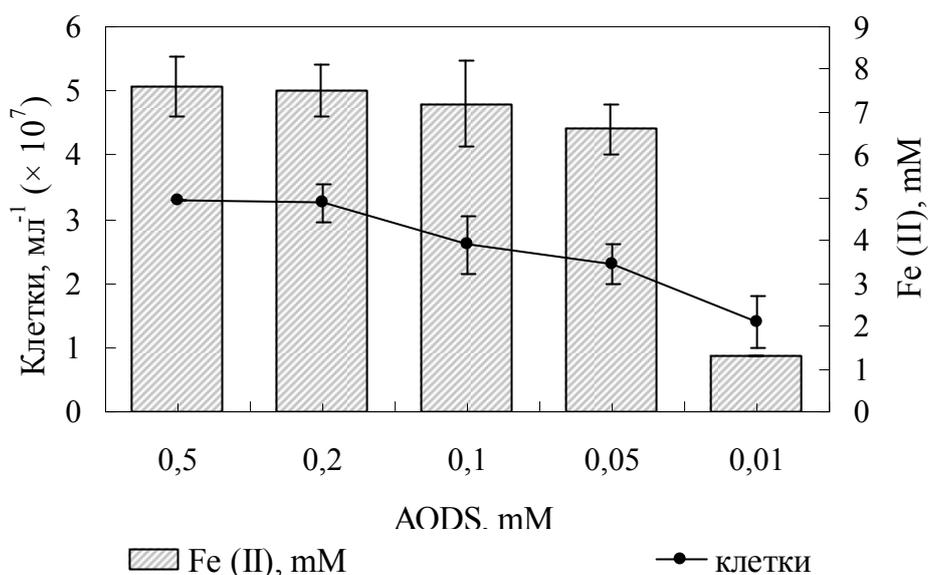


Рисунок 8. Рост штамма 64_FGQ^T и образование железа двухвалентного при различных концентрациях АХДС в среде.

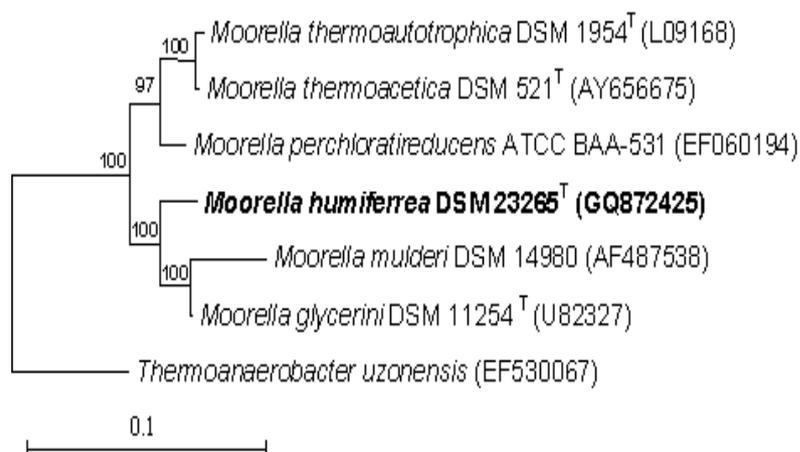
В экспериментах урожай клеток коррелировал с образованием Fe(II). Концентрация образованного железа двухвалентного в среде составляла около 8 мМ, при концентрациях АХДС 0,1, 0,2, 0,5 и 0,01 мМ, при таких незначительных концентрациях АХДС, исходя из молярного соотношения АХДС и Fe(II) (1 молекула АХДС₂ способна восстановить 2 молекулы Fe(OH)₃), не могло образоваться такое количество Fe(II). Следовательно, АХДС выступает в этих реакциях в качестве переносчика электронов от клеток к минералу по циклическому механизму, многократно восстанавливаясь и окисляясь в прежнее состояние. Минимальная концентрация АХДС, необходимая для обеспечения клеток энергией в результате регенерации шатл-соединения путем восстановления Fe(III), составила 0,05 мМ.

Продукты метаболизма. Продукты метаболизма были измерены в культуре выросшей в оптимальных условиях с максимальным урожаем клеток в стационарной фазе роста. При росте штамма 64_FGQ^T с АХДС в качестве акцептора электронов лактат окислялся не полностью, с образованием в жидкой фазе ацетата в соотношении 1,5:1. Рост штамма 64_FGQ^T на фруктозе также приводил к образованию в жидкой фазе ацетата. Образования других продуктов в жидкой и газовой фазах не происходило.

Нуклеотидный состав ДНК. Содержание ГЦ пар в ДНК штамма 64_FGQ^T составило 51 мол. %.

Филогенетический анализ. На основе сравнения нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК штамма 64_FGQ^T с другими представителями термофильных микроорганизмов было показано филогенетическое положение нового изолята в монофилитической группе представителей рода *Moorella* внутри семейства *Thermoanaerobacteraceae* класса *Clostridia* (рис. 9). Сходство с ближайшим организмом *M. glycerini* DSM 11254^T составляет 96%.

Рисунок 9. Дендрограмма представителей рода *Moorella*, построенная на основе сравнения генов 16S рРНК, показывающая филогенетическое положение нового штамма *Moorella humiferrea*. Шкала отражает 1 замену на 10 нуклеотидов.



Выделенный из горячего источника Долины Гейзеров новый штамм 64_FGQ^T обладает характерными признаками рода *Moorella*. Штамм 64_FGQ^T является строгим анаэробом и умеренным термофилом. Согласно данным филогенетического анализа, изолят попадает в кластер термофильных гомоацетогенных бактерий, сходство с ближайшим организмом *M. glycerini* DSM 11254^T составляет 96%. На основании фенотипических и генотипических отличий нового штамма 64_FGQ^T от других представителей рода *Moorella* (см. табл. 3) мы считаем правомерным отнесение изолята к новому виду рода *Moorella* и предлагаем название *Moorella humiferrea*, sp. nov.

Описание *Moorella humiferrea*, sp. nov. *Moorella humiferrea* (hu.mi.fer.re'a. L. adj. humi – гумус; L. n. ferrum – железо; N. L. fem. adj. *humiferrea*, имеющая отношение к гумусу и железу).

Колонии округлые белые. Клетки – прямые или изогнутые палочки, одиночные или в цепочках из нескольких клеток, размером 2–5×0,3–0,5 мкм, с перитрихальным жгутикованием. Клеточная стенка грамположительного типа. В стационарной фазе роста образует термостабильные споры. Деление посредством перетяжки. Облигатный анаэроб и гетеротроф. Термофил, рост в диапазоне температур 46–70°C, с оптимум 65°C. Спектр утилизируемых субстратов (с акцептором электронов) включает: глицерин, дрожжевой экстракт, лактат, пептон и пируват. Сбраживает арабинозу, галактозу, фруктозу, мальтозу, сахарозу, пептон и пируват. Штамм 64_FGQ^T использует в качестве акцепторов электронов АХДС, гуминовые кислоты, нитрат, перхлорат, тиосульфат. Ферригидрит восстанавливает в присутствии небольших количеств растворимых веществ-переносчиков электронов.

Таблица 3. Сравнительные характеристики нового изолята с близкородственными представителями рода *Moorella*

Характеристика	<i>M. humiferrea</i>	<i>M. perchloratireducens</i>	<i>M. mulderi</i>	<i>M. glycerini</i>	<i>M. thermoautotrophica</i>	<i>M. thermoacetica</i>
Место выделения	Долина Гейзеров, Камчатка	Подземное газовое хранилище	Анаэробный биореактор	Йеллоустоунский национальный парк	Образцы почвы и осадка	Конский навоз
Размер клеток (мкм)	0,3-0,5×2-5	0,5×2-9	0,4-0,6×2-8	0,4-0,6×3-6,5	0,8-1,0×3-6	0,4×2,8
Температурные пределы для роста (оптимум), °С	46-70 (65)	40-70 (55-60)	40-70 (65)	43-65 (58)	36-70 (55-58)	45-65 (55-60)
Оптимум pH	7,0	6,5-7,0	7,0	6,3-6,5	5,7	6,9
Содержание ГЦ пар в ДНК, мол.%.	51	58	54	55	54	54
Доноры электронов и источники углерода:						
Н ₂ -СО ₂	-	-	+	-	+	+/-
Формиат	-	-	+	-	+	+/-
Метанол	-	+	+	-	+	+
Глюкоза	-	+	+	+	+	+
Манноза	-	+	-	+	-	-
Целлобиоза	-	+	+	-	-	-
Акцепторы электронов:						
Нитрат	+	+	-	-	+	+
Перхлорат	+	+	+	+	-	-
Ссылки	данное исследование	Balk et al., 2008	Balk et al., 2003	Slobodkin et al., 1997	Wiegel et al., 1981	Fontaine et al., 1942

Образует ацетат при окислении и сбраживании органических субстратов. Содержание Г+Ц в ДНК составляет 51 мол. %. Регистрационный номер последовательности гена 16S рРНК штамма 64_FGQ^T в GenBank – GQ872425. Типовой штамм 64_FGQ^T (=ВКМ В-2603^T, = DSM 23265^T). Выделен из сообщества микроорганизмов, способных использовать слабокристаллический оксид Fe(III) в качестве акцептора электронов, полученного из наземной гидротермы Долины Гейзеров (Камчатка).

3.2. Общая характеристика новых представителей филогенетического типа *Planctomycetes*

В результате филогенетического исследования в трех накопительных культурах с ацетатом и ферригидритом в гранулах альгината были обнаружены микроорганизмы, ближайшими родственниками которых являются некультивируемые прокариоты. Накопительные культуры, содержащие эти микроорганизмы, были получены из образцов Восточного поля, участка Тростниковый (кальдера Узон) и гейзера Грот (Долина Гейзеров). Ближайшей в GenBank была последовательность гена 16S рРНК принадлежащая бактериальному клону, впервые полученному при описании филогенетического разнообразия Йеллоустонского национального парка (США, Hugenholtz et al., 1998) и в дальнейшем детектированному молекулярными методами в Австрии, Германии и Греции (номера нуклеотидных последовательностей в GenBank AM902600, FN436200, EF444704, соответственно). Уровень сходства нуклеотидных последовательностей составил 96%. Филогенетический анализ последовательностей генов 16S рРНК определил данные микроорганизмы в единый кластер с таксономически описанными представителями типа *Planctomycetes* (см. рис. 4).

Флуоресцентная *in situ* гибридизация. Принадлежность найденных бактерий к филогенетическому типу *Planctomycetes* была подтверждена флуоресцентной *in situ* гибридизацией клеток с таксон-специфичным зондом PLA886. Во всех экспериментах, проводимых с культурами *Planctomycetes*, наличие бактерий детектировали методом флуоресцентной *in situ* гибридизацией клеток.

Морфология клеток. Клетки были эллипсоидной формы, имели кратерообразные структуры, пили и размер 2,0-4,0 мкм (рис. 10, 1) Культуры клеток образовывали стебельковые выросты цитоплазмы и группировались между собой, образуя "розеточные" структуры (рис. 10, 2).

Параметры роста. Диапазон температур для роста составляет 46-70°C, с оптимумом – 65°C. Рост отсутствовал при температурах культивирования 37 и 75°C. В экспериментах по определению концентраций кислорода воздуха, допустимых для развития микроорганизмов, было установлено отсутствие способности развиваться в аэробных и микроаэробных условиях культивирования (3% кислорода).

В результате множественных попыток выделить чистые культуры микроорганизмов принадлежащих к филогенетическому типу *Planctomycetes* методом предельных разведений и высевам в среды с антибиотиками была выявлена устойчивость *Planctomycetes* к антибиотикам: ампициллину (100 мкг),

пенициллину (10 мкг) и карбоксициллину (10 мкг). Культуры не требовали добавления дрожжевого экстракта в качестве фактора роста. При наблюдении в световой микроскоп препаратов исследуемых накопительных культур доминирующими являются клетки представителей типа *Planctomycetes* (около 90%), также встречаются единичные прямые палочки. В накопительных культурах, в которых были идентифицированы *Planctomycetes*, невооруженным глазом были видны белые, иногда желтоватые, образования на поверхности гранул альгината. При наблюдении в световой микроскоп клетки обнаруживаются непосредственно во фрагментах альгинатных гранул. Как правило, клетки не просматривались при фазово-контрастной световой микроскопии из-за плотных пленок альгината. Также было замечено, что при приготовлению препаратов клеток для микроскопирования должно предшествовать тщательное встряхивание (vortex, 5 мин.) пробирок с культурами. В условиях культивирования с ацетатом, суспендированным в среде ферригидритом и с добавлением 0,2% раствора альгината рост представителей типа *Planctomycetes* не отмечался. Микроорганизмы детектировали в условиях замещения ферригидрита на другой растворимый акцептор [цитрат Fe(III), нитрат] в присутствии гранул альгината в среде. Представители типа *Planctomycetes* не развивались при культивировании с цитратом Fe(III) или нитратом в условиях замещения гранул альгината жидким субстратом.

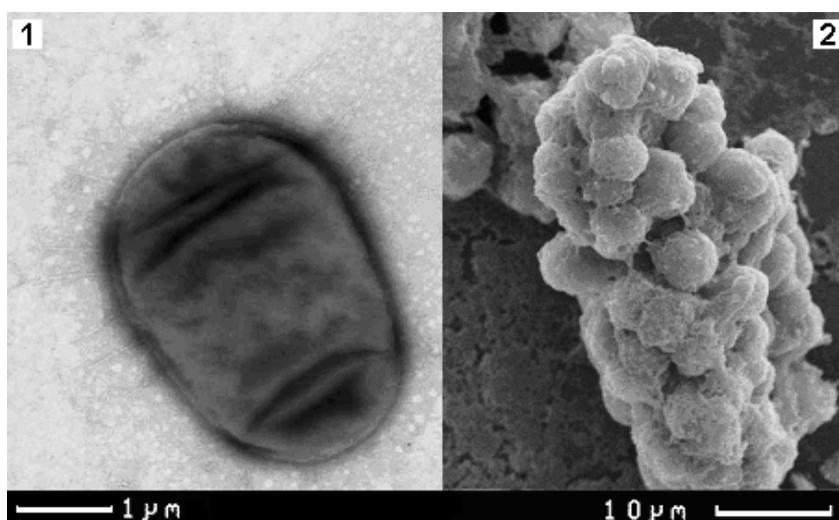


Рисунок 10.
Микрофотографии
клеток представителей
типа *Planctomycetes*
1-негативное
окрашивание;
2-сканирующая
электронная
микроскопия

Представители филогенетического типа *Planctomycetes* формируют обособленную глубокую линию в домене *Bacteria*, имеют уникальные последовательности в гене 16S рНК противопоставляющие их остальным бактериям и характеризуются специфической морфологией и ультраструктурой клеток, заключающейся в компартиментализации внутриклеточного материала и образовании уникальных мембранных структур. Некультивируемые представители планктомицетов повсеместно представлены в природных экосистемах и детектируются с использованием различных молекулярно-генетических подходов. При поиске в нуклеотидной базе данных (GenBank) по

ключевым словам «*Planctomycetes*, 16S rRNA» обнаруживаются 8564 нуклеотидных последовательности. Несмотря на такое широкое распространение некультивируемых планктомицетов в различных экосистемах выделены в чистую культуру и валидно описаны всего девять родов этого филогенетического типа. Чистые культуры представителей *Planctomycetes* являются аэробными хемогетеротрофными микроорганизмами. За исключением умеренно термофильного штамма *Isosphaera pallida* (диапазон температур для роста составляет 34-55, с оптимумом 41°C, Giovannoni et al., 1987) представители типа *Planctomycetes* являются мезофильными аэробными бактериями. Мезофильные анаэробные представители планктомицетов, осуществляющие процессы анаэробного окисления аммония, поддерживаются в лабораторных условиях, однако в чистую культуру не выделены и представлены в GenBank как '*Candidatus*' (Strous et al., 1999, Jetten et al., 2005). Сведения о культивируемых термофильных анаэробных планктомицетах до настоящего исследования отсутствовали.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного анализа определен филогенетический состав термофильных железовосстанавливающих микробных сообществ из наземных гидротерм Камчатки развивающихся при наличии и отсутствии прямого контакта клеток прокариот со слабокристаллическим оксидом Fe(III). Железовосстанавливающие накопительные культуры, полученные в разных условиях, различаются по филогенетическому составу. К таксономическим группам прокариот, культивируемые представители которых могут принимать участие в восстановлении нерастворимых соединений трёхвалентного железа при повышенных температурах, относятся следующие филогенетические типы: *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, *Thermotogae*, *Crenarchaeota*, во всех культурах количественно преобладают филоциты, относящиеся к филогенетическому типу *Firmicutes*. Специфических филогенетических групп микроорганизмов, которые преобладают либо в условиях свободного, либо ограниченного доступа клеток к ферригидриту, в присутствии и отсутствии экзогенного переносчика электронов не выявлено. Наиболее часто в накопительных культурах, как при свободном, так и при ограниченном доступе к ферригидриту детектируются представители родов *Carboxydotherrmus* и *Thermoanaerobacter*, которые, очевидно, обладают наиболее эффективными механизмами железоредукции в исследованном диапазоне температур. Вероятно, реализация той или иной стратегии железоредукции является специфическим свойством для вида или штамма, а не для всех представителей рода в целом, и играет физиологическую роль в конкретных местах обитания и может оказаться значимой при смене экологических условий. Установлено, что филогенетическое разнообразие микроорганизмов выше в присутствии в среде культивирования ацетата в качестве потенциального донора железоредукции, чем лактата. При повышенных температурах культивирования значительно уменьшается количество и филогенетическое разнообразие прокариот.

Представители гипертермофильных архей филогенетического типа *Crenarchaeota* детектируются при температуре инкубации 80°C. Показано, что в присутствии в среде гранул альгината в накопительных культурах обнаружены микроорганизмы, ближайшими родственниками которых являются некультивируемые организмы.

Из термофильной накопительной культуры железовосстанавливающих микробных сообществ, полученной из Долины Гейзеров, в чистую культуру выделен анаэробный термофильный штамм 64_FGQ^T. Выявленные морфологические, физиологические и филогенетические различия нового изолята с близкородственными микроорганизмами позволяют отнести его к новому виду рода *Moorella* - *Moorella humiferrea*, sp. nov. Новый штамм 64_FGQ^T способен восстанавливать ферригидрит в присутствии незначительного количества в среде гуминовых кислот, такое абиотическое восстановление Fe(III) обеспечивает клетку энергией для поддержания роста. В наземных гидротермах с обильными отложениями окисных соединений железа трехвалентного и отсутствии других используемых для роста соединений, новый изолят, возможно, получает энергию для роста и жизнедеятельности в результате регенерации веществ переносчиков, которая обеспечивается восстановлением Fe(III). Такими веществами в данных гидротермах могут выступать гуминовые кислоты, способные к многократному восстановлению и окислению и, следовательно, даже их незначительные количества играют важную роль в восстановлении Fe(III). Согласно концепции «внеклеточного переноса электронов» (Hernandez and Newman, 2001; Stams et al., 2006; Lovley, 2008) экзогенный медиатор железоредукции биотически восстанавливается (энзиматическое восстановление), получая электроны от клетки бактерии, который, в свою очередь, передает электроны к минералам Fe(III), химически восстанавливая последний (неэнзиматическое восстановление). Несмотря на то, что конкретные механизмы, приводящие к уменьшению степени окисления металла, могут быть различными, как прямая энзиматическая, так и биотически опосредованная неэнзиматическая железоредукция сопровождаются переносом электронов, генерируемых в реакциях микробного метаболизма. Полученные результаты расширяют наши возможности в понимание экологической роли нового изолята в микробных железовосстанавливающих сообществах в природных экосистемах.

Обнаружено, что в присутствии гранул альгината и Fe(III), в устойчивых накопительных культурах детектируются микроорганизмы филогенетического типа *Planctomycetes*, имеющие лишь отдалённое родство с известными культивируемыми видами. Впервые получен культивируемый представитель анаэробных термофильных планктомицетов. Обнаруженный микроорганизм восстанавливает ферригидрит и цитрат Fe(III) в присутствии в среде гранул альгината и не развивается в условиях замещения гранул альгината жидким субстратом, по-видимому, в данных условиях культивирования, клетки не способны развиваться в жидкой среде и требуют прикрепления к твердому субстрату. Проведенное исследование расширяет наши знания в понимание биологии представителей типа *Planctomycetes* и может оказаться полезным в

разработке методов для выделения чистых культур относящихся к новым таксонам, принципиально отличающихся от других микроорганизмов и обладающих, возможно, неизвестными интересными и функционально значимыми свойствами.

ВЫВОДЫ

1. Железовосстанавливающие накопительные культуры термофильных микроорганизмов, полученные при наличии или отсутствии прямого контакта клеток с минералом Fe(III), имеют различный филогенетический состав, однако, во всех культурах количественно преобладают флотипы, относящиеся к филогенетическому типу *Firmicutes*. Наиболее часто в накопительных культурах как при наличии, так и в отсутствие прямого контакта клеток с ферригидритом, выявляются представители родов *Carboxydotherrnus*, *Thermoanaerobacter* и *Thermotoga*, которые, очевидно, обладают наиболее эффективными механизмами железоредукции в исследованном диапазоне температур. Вероятно, реализация той или иной стратегии железоредукции является специфическим свойством для вида или штамма, а не для всех представителей рода в целом.

2. Выделен в чистую культуру, таксономически охарактеризован и описан новый вид анаэробной термофильной бактерии *Moorella humiferrea*, sp. nov. Новый изолят способен сопрягать процессы восстановления нерастворимых оксидов Fe(III) с использованием гуминовых кислот в качестве акцептора и переносчика электронов.

3. Обнаружено, что компонентом термофильного железовосстанавливающего сообщества являются термофильные анаэробные бактерии, относящиеся к филогенетическому типу *Planctomycetes*. Впервые получен культивируемый представитель анаэробных термофильных планктомицетов, требующий для роста наличия в среде трёхвалентного железа и твёрдой фазы для прикрепления клеток.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Непомнящая Я.Н.**, Слободкина Г.Б., Колганова Т.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Нетрусов А.И., Слободкин А.И. Филогенетический состав накопительных культур термофильных прокариот, восстанавливающих слабокристаллический оксид Fe(III) при наличии и отсутствии прямого контакта клеток с минералом // Микробиология. 2010. Т. 79, № 5. С. 672-681

2. **Непомнящая Я.Н.**, Slobodkina G.B., Baslerov R.V., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Netrusov A.I., Slobodkin A.I.. *Moorella humiferrea*, sp. nov., a novel thermophilic anaerobic, bacterium capable of growth via electron shuttling between humic acids and Fe(III) // Int J Syst Evol Microbiol. 2010. (submitted).

3. **Непомнящая Я.Н.** Филогенетический состав микробного сообщества термофильных анаэробных микроорганизмов диссимиляционно восстанавливающих нерастворимые формы трехвалентного железа / Тезисы международной молодежной конференции «Ломоносов 2009» 13 – 18 апреля. 2009. Москва. С. 14-15.

4. **Непомнящая Я.Н.**, Slobodkina G., Kolganova T., Bonch-Osmolovskaya E., Netrusov A., Slobodkin A. Phylogenetic analysis of the thermophilic microbial enrichment cultures that reduce insoluble poorly crystalline Fe(III) oxide / Abstracts of the International Conference on Biology of Thermophiles, «Thermophiles 2009». August 16 - 21. 2009. Beijing, China. P. 75.

5. **Непомнящая Я.Н.**, Слободкина Г.Б., Колганова Т.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Нетрусов А.И., Слободкин А.И. '*Moorella quinolica*' sp. nov.- новая термофильная анаэробная бактерия из наземных гидротерм Камчатки / Тезисы V Молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» 26 — 27 октября. 2009. Москва. С. 42-43.

6. **Непомнящая Я.Н.** Обнаружение и культивирование термофильных анаэробных представителей филогенетического типа *Planctomycetes* / Тезисы международной молодежной конференции «Ломоносов 2010» 12 – 15 апреля. 2010. Москва. С. 178.

7. Slobodkin A.I., **Непомнящая Я.Н.**, Gavrilov S.N., Slobodkina G.B. Reduction of insoluble electron acceptors by thermophilic prokaryotes / Abstracts of the 8th International Congress on Extremophiles, «Extremophiles 2010». September 12-16. 2010. Ponta Delgada, Portugal. P. 310.