

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

ФРОЛОВА АНАСТАСИЯ АНДРЕЕВНА

**НОВЫЕ АНАЭРОБНЫЕ АЛКАЛОФИЛЬНЫЕ
МИКРООРГАНИЗМЫ ИЗ НАЗЕМНЫХ ГРЯЗЕВЫХ ВУЛКАНОВ**

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
1.5.11. Микробиология

Научный руководитель:
Доктор биологических наук
Слободкин А.И.

Москва – 2024

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	8
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ НАУЧНО- КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ.....	12
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
ГЛАВА 1. Грязевые вулканы.....	14
1.1. История изучения грязевых вулканов	14
1.2. Строение и распространение грязевых вулканов.....	16
1.2.1. Распространение наземных грязевых вулканов.....	19
1.3. Значение наземных грязевых вулканов	20
1.4. Микробные сообщества наземных грязевых вулканов.....	21
1.4.1. Новые таксоны микроорганизмов, выделенные из наземных грязевых вулканов	31
ГЛАВА 2. АЛКАЛОФИЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ	35
2.1. Определение и общие сведения об алкалофильных микроорганизма ..	35
2.2. Местообитания алкалофильных микроорганизмов.....	37
2.3 Алкалофильные сульфатвосстанавливающие бактерии.....	39
2.3.1. Филогенетическое разнообразие алкалофильных сульфатвосстанавливающих бактерий	39
2.3.2. Физиологическое разнообразие алкалофильных сульфатвосстанавливающих бактерий	40
2.3.3. Экологическое разнообразие алкалофильных сульфатвосстанавливающих бактерий	41

2.4. Алкалофильные нитратвосстанавливающие микроорганизмы	46
2.4.1. Филогенетическое разнообразие алкалофильных нитратвосстанавливающих бактерий.....	46
2.4.2. Физиологическое разнообразие алкалофильных нитратвосстанавливающих бактерий.....	48
2.4.3. Экологическое разнообразие алкалофильных нитратвосстанавливающих бактерий.....	49
2.5. Алкалофильные микроорганизмы, сбраживающие соединения углерода	55
2.5.1. Филогенетическое разнообразие микроорганизмов, сбраживающих углеродные соединения.....	55
2.5.2. Физиологическое разнообразие микроорганизмов, сбраживающих углеродные соединения.....	58
2.5.3 Экологическое разнообразие микроорганизмов, сбраживающих углеродные соединения.....	59
2.6. Значение алкалофильных микроорганизмов	70
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	72
ГЛАВА 3. Материалы и методы исследования	72
3.1. Объекты исследования	72
3.2. Методы исследования.....	73
3.2.1. Отбор проб.....	73
3.2.2. Состав сред и условия культивирования.....	73
3.2.3. Получение чистых культур	76
3.2.4. Исследование морфологии и тонкого строения клеток.....	77

3.2.5. Диапазоны температуры, рН, концентрации NaCl.....	77
3.2.6. Использование доноров и акцепторов электронов.....	78
3.2.7. Аналитические методы.....	78
3.2.8. Хемотаксономический анализ	79
3.2.9. Выделение ДНК	79
3.2.10. Филогенетический анализ.....	80
3.2.11. Секвенирование и анализ полного генома	81
3.2.12. Оценка распространённости новых микроорганизмов.....	82
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	83
4.1 Выделение и описание новой алкалофильной анаэробной бактерии, сбраживающей углеродные соединения <i>Anaerotalea alkaliphila</i> gen. nov. sp. nov.....	84
4.1.1. Морфология клеток штамма F-3ap ^T	84
4.1.2. Характеристики роста штамма F-3ap ^T	85
4.1.3. Метаболизм штамма F-3ap ^T	86
4.1.4. Состав жирных кислот и липидов мембран штамма F-3ap ^T	87
4.1.5 Геносистематические характеристики штамма F-3ap ^T	87
4.1.5.1. Анализ генома штамма F-3ap ^T	89
4.1.5.2. Филогенетическое положение штамма F-3ap ^T	90
4.1.6. Сравнение ключевых характеристик штамма F-3ap ^T с представителями других родов порядка <i>Clostridiales</i>	94

4.2. Выделение и описание новой алкалофильной анаэробной сульфатвосстанавливающей бактерии <i>Pseudodesulfovibrio alkaliphilus</i> sp. nov.	98
4.2.1. Морфология клеток штамма F-1 ^T	98
4.2.2. Характеристики роста штамма F-1 ^T	100
4.2.3. Метаболизм штамма F-1 ^T	100
4.2.4. Состав жирных кислот и липидов мембран штамма F-1 ^T	101
4.2.5 Геносистематические характеристики штамма F-1 ^T	102
4.2.5.1. Анализ генома штамма F-1 ^T	104
4.2.5.2. Филогенетическое положение штамма F-1 ^T	105
4.2.6. Сравнение ключевых характеристик штамма F-1 ^T с другими представителями рода <i>Pseudodesulfovibrio</i>	107
4.3 Выделение и описание новой алкалофильной галотолерантной нитратвосстанавливающей бактерии ' <i>Sulfurospirillum tamanensis</i> ' sp. nov.	111
4.3.1. Морфология клеток штамма T05b ^T	111
4.3.2. Характеристики роста штамма T05b ^T	112
4.3.3. Метаболизм штамма T05b ^T	112
4.3.4. Состав жирных кислот и липидов мембран штамма T05b ^T	116
4.3.5 Геносистематические характеристики штамма T05b ^T	116
4.3.5.1. Анализ генома штамма T05b ^T	118
4.3.5.2. Филогенетическое положение штамма T05b ^T	120
4.3.6. Сравнение ключевых характеристик штамма T05b ^T с другими представителями рода <i>Sulfurospirillum</i>	122

4.4 Выделение и описание новой алкалофильной сульфатвосстанавливающей бактерии ' <i>Desulfobotulus pelophilus</i> ' sp. nov.....	126
4.4.1 Морфология клеток штамма H1 ^T	126
4.4.2 Характеристика роста штамма H1 ^T	126
4.4.3 Метаболизм штамма H1 ^T	127
4.4.4 Состав жирных кислот мембран штамма H1 ^T	128
4.4.5 Геносистематические характеристики штамма H1 ^T	128
4.4.5.1 Анализ генома штамма H1 ^T	130
4.4.5.2 Филогенетическое положение штамма H1 ^T	131
3.4.6 Сравнение ключевых характеристик штамма H1 ^T с другими представителями рода <i>Desulfobotulus</i>	133
4.5 Выделение и описание новой алкалофильной анаэробной бактерии, сбраживающей углеродные соединения ' <i>Petrocella pelovolcani</i> ' sp. nov...	136
4.5.1 Морфология клеток штамма FN5suc ^T	136
4.5.2 Характеристика роста штамма FN5suc ^T	137
4.5.3 Метаболизм штамма FN5suc ^T	137
4.5.4 Состав жирных кислот мембран штамма FN5suc ^T	138
4.5.5 Геносистематические характеристики штамма FN5suc ^T	138
4.5.5.1. Анализ генома штамма FN5suc ^T	140
4.5.5.2 Филогенетическое положение штамма FN5suc ^T	141
4.5.6 Сравнение ключевых характеристик штамма FN5suc ^T с другим представителем рода <i>Petrocella</i>	143

4.6. Географическое распространение родов микроорганизмов, исследованных в данной работе и их встречаемость в различных местообитаниях	145
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	153
ВЫВОДЫ.....	155
БИБЛИОГРАФИЯ.....	156
ПРИЛОЖЕНИЕ	186

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Микроорганизмы играют решающую роль в биогеохимических циклах углерода, азота и серы в подземных экосистемах. В то же время, ряд процессов микробной трансформации основных биогенных элементов прокариотами еще очень мало изучены. Выделение микроорганизмов, осуществляющих эти процессы, и изучение их метаболических свойств создает основу для понимания фундаментальных вопросов, связанных с происхождением жизни, эволюции биосферы, микробной экологии и биогеохимии. Кроме того, бактерии и археи с необычными характеристиками могут служить источником ценных биотехнологических продуктов. Грязевые вулканы связаны с потоками вещества, поступающими с глубины 1-3 км, и таким образом служат «окнами в подземную биосферу». Кроме этого, грязевой вулканизм является значимым геологическим явлением, имеющим большое значение для баланса атмосферного метана (25-30% эмиссии геологического метана), и таким образом оказывает влияние на процессы глобального потепления. Присутствие в грязевом флюиде различных неорганических и органических соединений, которые могут быть использованы в качестве доноров и акцепторов электронов в энергетическом метаболизме, позволяет развиваться микроорганизмам с различной физиологией.

Микробиологические исследования наземных грязевых вулканов, в основном описывают общее микробное разнообразие с помощью молекулярных подходов, что не позволяет получить верифицированные данные о функциональных возможностях различных таксономических групп прокариот. К началу наших исследований, лишь немногочисленные нейтрофильные микроорганизмы были выделены в чистые культуры из наземных грязевых вулканов и впоследствии валидно описаны. О выделении алкалофильных (т.е. имеющих оптимальный рН роста выше 9,0)

микроорганизмов из грязевых вулканов до выполнения данной работы не сообщалось, что делает представляемое исследование особенно актуальным.

Цели и задачи исследования. Цель работы – изучение функционального разнообразия культивируемых анаэробных микроорганизмов, населяющих наземные грязевые вулканы.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Выделить чистые культуры анаэробных микроорганизмов, участвующих в трансформации соединений углерода, серы и азота, из наземных грязевых вулканов полуострова Тамань.
2. Охарактеризовать физиологию выделенных изолятов и установить их таксономическое положение. При необходимости провести описание и узаконивание имен новых таксонов в соответствии с международными стандартами.
3. Оценить метаболический потенциал выделенных микроорганизмов на основании данных секвенирования их полных геномов.
4. Определить географическое распространение выделенных микроорганизмов и их встречаемость в различных биотопах.

Научная новизна и теоретическая значимость работы.

Первые алкалофильные анаэробные микроорганизмы из наземных грязевых вулканов были выделены в ходе выполнения данной работы. Описаны и узаконены как новые таксоны 5 новых видов и 1 новый род анаэробных алкалофильных бактерий.

Новые изоляты являются представителями различных физиологических групп: сульфатредуцирующими микроорганизмами (*Pseudodesulfovibrio alkaliphilus* и *Desulfobotulus tamanensis*); микроорганизмами, сбразивающими органические соединения (*Anaerotalea alkaliphila* и *Petrocella pelovolcania*); нитратвосстанавливающими микроорганизмами (*Sulfurospirillum tamanensis*).

Результаты данной работы представляют новую информацию о биологическом разнообразии анаэробных прокариот, участвующих в

метаболизме серы, азота и углерода – их филогении, таксономии и метаболизме.

Практическая значимость работы.

Основной практической значимостью настоящего исследования является выделение новых штаммов алкалофильных анаэробных прокариот. Экстремофильные микроорганизмы, участвующие в глобальных циклах серы, азота и углерода, могут являться потенциальными источниками ферментов, представляющих ценность для использования в производствах с высокими значениями рН среды. Выделенные штаммы могут служить объектами для изучения путей их энергетического и конструктивного метаболизма посредством методов полногеномного секвенирования, транскриптомики и протеомики.

Положения, выносимые на защиту.

1. Микроорганизмы, выделенные из грязевых вулканов, способны к устойчивому росту за счет окисления или восстановления соединений серы и восстановления нитрата.
2. Выделенные микроорганизмы относятся к новым таксонам, представленными одним новым родом и 4 новыми видами, ранее известных родов
3. Метаболический потенциал, кодируемый в геномах выделенных штаммов, соответствует физиологическим данным, полученным при лабораторном культивировании.
4. Выделенные микроорганизмы относятся и к географически широко распространенным группам, так и к группам, имеющим ограниченное распространение.

Личный вклад соискателя.

Соискатель лично принимал участие во всех этапах работы: проведении экспериментов по получению накопительных и чистых культур

микроорганизмов, описанию физиологических свойств новых изолятов, анализу их метаболического потенциала по данным полногеномного секвенирования, в обработке и обобщении полученных результатов и написании статей и тезисов конференций.

Апробация работы.

Материалы диссертации были представлены на: 2-ом Российском микробиологическом конгрессе (Саранск, 2019 г.); конференции «Микроорганизмы: Вопросы экологии, физиологии, биотехнологии: Всероссийская конференция с международным участием» (Москва, 2019 г.); XIII Молодежной Школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2022 г.)

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа изложена на 207 страницах машинописного текста и включает 22 рисунка и 21 таблицу. Работа состоит из введения, обзора литературы (2 главы), экспериментальной части (2 главы), заключения, выводов и списка литературы, который содержит 271 наименование.

Место проведения работы и благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.б.н. Слободкину А.И. за предложенную тему, постоянное внимание и существенную помощь в планировании работы и обсуждении ее результатов. Особую благодарность автор приносит заведующей отделом биологии экстремофильных микроорганизмов д.б.н. Бонч-Осмоловской Е.А. и заведующему лабораторией метаболизма экстремофильных прокариот к.б.н. Фролову Е.Н. за содействие и поддержку, а также сотрудникам отдела биологии экстремофильных микроорганизмов д.б.н. Слободкиной Г.Б., к.б.н. Меркелю А.Ю., к.б.н. Хомяковой М.А., к.б.н. Кочетковой Т.В., к.б.н. Прокофьевой М.И. за полезные советы и помощь в начинаниях. Автор искренне благодарит всех сотрудников и аспирантов отдела биологии экстремофильных микроорганизмов за

доброжелательную и творческую атмосферу в коллективе, за мотивацию и уважительное отношение к труду коллег. Автор выражает признательность всем коллегам, принимавшим участие в различных этапах работы: д.б.н. Пименову Н.В., Кострикиной Н.А., к.х.н. Новикову А.А., к.б.н. Копицыну Д.С.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ НАУЧНО-КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Экспериментальные статьи

1. **Frolova A. A.**, Merkel A.Yu., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Anaerotalea alkaliphila* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, anaerobic, fermentative bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // *Extremophiles*. – 2021a. – V. 25. – P. 301–309. doi: 10.1007/s00792-021-01229-w.
2. **Frolova A. A.**, Merkel A.Yu., Kuchierskaya A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Pseudodesulfovibrio alkaliphilus*, sp. nov., an alkaliphilic sulfate-reducing bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2021b. – V. 114. – P. 1387–1397. doi: 10.1007/s10482-021-01608-5.
3. **Фролова А.А.**, Меркель А.Ю., Кевбрин В.В., Копицын Д.С., Слободкин А.И. *Sulfurospirillum tamanensis* sp. nov., факультативно анаэробная алкалофильная бактерия из наземного грязевого вулкана // *Микробиология*. 2023а. – Т. 92. – № 1. – С. 14-23. doi: 10.1134/S0026261722602226.
4. **Фролова А.А.**, Меркель А.Ю., Кучиерская А.А., Слободкин А.И. *Desulfobotulus pelophilus* sp. nov., – алкалофильная сульфатвосстанавливающая бактерия из наземного грязевого вулкана // *Микробиология*. – 2023б. – Т. 92. – № 4. – С. 358-365. doi: 10.1134/S0026261723600878.
5. **Frolova A.A.**, Merkel A.Yu., Kopitsyn D.S., Slobodkin A.I. *Petrocella pelovolcani* sp. nov., an alkaliphilic anaerobic bacterium isolated from terrestrial mud

volcano // Microbiology (Moscow). – 2024. – V. 93. № 4. P. 391-398. doi: 10.1134/S0026261724605803.

Тезисы конференций

1. Фролова А.А., Бонч-Осмоловская Е.А., Слободкин А.И. ‘*Anaerocalibacter tamaniensis*’ gen nov., sp. nov. новый анаэробный микроорганизм из грязевого вулкана Таманского полуострова. 2-й Российский Микробиологический Конгресс. (г. Саранск, 23 – 27 сентября 2019 г.): материалы Конгресса. Стр. 157 – 158.

2. Фролова А.А., Бонч-Осмоловская Е.А., Слободкин А.И. ‘*Pseudodesulfovibrio alkaliphilus*’ sp. nov., новый анаэробный сульфатвосстанавливающий микроорганизм из грязевого вулкана Таманского полуострова. Микроорганизмы: Вопросы экологии, физиологии, биотехнологии: Всероссийская конференция с международным участием. МГУ имени М.В. Ломоносова. Биологический факультет. (г. Москва, 23-24 декабря 2019 г.). Материалы: Стр. 127.

3. Фролова А.А., Меркель А.Ю., Кевбрин В.В., Копицын Д.С., Слободкин А.И. ‘*Sulfurospirillum tamanensis*’ sp. nov. – новая факультативно анаэробная, алкалифильная бактерия из наземного грязевого вулкана Таманского полуострова. Актуальные аспекты современной микробиологии: XIII молодежная школа-конференция с международным участием. (г. Москва, 16-18 ноября 2022 г.). Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН. – Москва: Ваш формат, 2022. Стр. 266-267.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА 1. Грязевые вулканы

Грязевые вулканы - это геологические структуры, образованные выбросами частиц глины и ила, брекчий, жидкостей и газов из глубоких осадочных слоев. Грязевой вулканизм имеет большое значение для исследования углеводородов, сейсмичности и баланса метана в атмосфере. Наземные грязевые вулканы геологически связаны с глубокими подземными залежами нефти и природного газа и содержат различные неорганические и органические соединения. Эти соединения микроорганизмы, могут использовать в качестве доноров и акцепторов электронов в своем метаболизме, чем и объясняется значительное филогенетическое разнообразие прокариот различной физиологии, выделенных в чистые культуры или детектируемых с помощью метагеномных исследований, из наземных грязевых вулканов (НГВ). К настоящему времени микробиологические исследования НГВ сосредоточены на прокариотах, участвующих в циклах метана и серы, и в основном описывают общее микробное разнообразие с помощью молекулярных подходов.

1.1. История изучения грязевых вулканов

Морские и наземные грязевые вулканы стали объектом широких исследований с начала 1900-ых годов (Губкин, 1938). Однако еще раньше, в начале XVIII века, петербургский академик Пётр Симон Паллас, исследовав грязевые вулканы Тамани и Керчи, пришёл к выводу, что на глубине существуют отложения каменного угля или битуминозного шифера в состоянии медленного горения. Немецкий геолог Г.В. Абих пришёл к выводу, что все грязевые вулканы приурочены к зонам разлома земной коры и образовались по законам той же динамики, что и вулканы магматические. Именно он в 60-ых годах XIX века ввёл термин *Mudvulkan*, в отечественной же

научной литературе определение «грязевой вулкан» принадлежит Г.П. Гельмерсену (Гнатенко и др., 1986).

О широком распространении грязевых вулканов на планете сегодня известно благодаря впечатляющему списку научных открытий второй половины XX – начала XXI века. Работы советских учёных в Каспийском регионе (Якубов и др., 1971) и в Чёрном море (Woodside, Ivanov, Limonov, 1998), а так же зарубежные исследования грязевых вулканов Средиземного моря с последующим открытием диапировых месторождений (Camerlenghi et al., 1992; Limonov et al., 1996) вызвали огромный интерес у многих научных институтов и побудили исследователей к циклу работ по этому направлению. Так, возглавляемая Российской Федерацией программа Плавающих университетов «Обучение через исследования», в период с 1991 по 2011 годы исследовали главные Средиземноморские и Черноморские месторождения грязевых вулканов, такие как иловое поле Анаксимандр, море Альборан, Поднятие ООН, Туапсинский и Сорокинский прогибы, хребты Шацкого и Андрусова. С течением времени исследования экспедиции расширились за пределы Средиземного моря, обнаружив крупные грязевулканические месторождения в Кадисском заливе, в районе конуса выноса Нила и в Норвежском море (Ivanov, Limonov, Weering van, 1996; Kenyon et al., 2003; Kenyon, Ivanov, Akhmetzhanov, 1998; Limonov et al., 1996; Woodside, Ivanov, Limonov, 1998). В 2001 году первый грязевой вулкан был обнаружен на дне озера Байкал (Исаев, 2015). С 2014 года международная экспедиция Class@Baikal в течение нескольких лет исследовала Байкальские грязевые вулканы, результатом чего стало открытие 22-х грязевых вулканов и детальное изучение нового гидратоносного Академического грязевулканического комплекса, расположенного в центральной части озера на Академическом хребте (Khlystov et al., 2019; Kudaeva et al., 2020).

Бурное развитие геологических исследований привело к тому, что к концу 1990-ых годов были обобщены основные концепции грязевых вулканов,

описывающие их распространение, тектоническую обстановку, активность и продукты, механизмы их образования (Dimitrov, 2002; Milkov, 2000). Помимо этого изучалась современная деятельность грязевых вулканов: описаны извержения наземных грязевых вулканов, в частности, на Тамани (горы Бориса и Глеба и Карabetова) и Керченском полуострове (Джарджарская сопка) (Гнатенко и др., 1986), и зафиксированы взрывные явления в грязевулканических очагах Тамани. Также было обнаружено, что почти повсеместно грязевые вулканы сопровождаются сульфидной минерализацией.

Таким образом, история изучения грязевого вулканизма составляет уже более 150-ти лет, а его связь с различными природными процессами и явлениями, так же, как и строение и механизм деятельности, до сих пор не получили исчерпывающего объяснения. Впрочем, за прошедшие два десятилетия множество новых геологических, геофизических и геохимических данных в некоторой степени расширили представления исследователей о грязевом вулканизме, что свидетельствует о неослабевающем исследовательском интересе к данной проблематике. Однако подавляющее число работ было посвящено геологическому аспекту феномена грязевого вулканизма, в то время как исследованию активности микробных процессов и разнообразию микроорганизмов уделялось намного меньше внимания.

1.2. Строение и распространение грязевых вулканов

Грязевулканическая постройка – тело грязевого вулкана, расположенного на поверхности Земли или на дне моря. Чаще всего она имеет вид полого или усеченного конуса, сложенного сопочной брекчией нескольких генераций. Вертикальный разрез грязевого вулкана состоит из трех элементов: тело, питающий (подводящий) канал и область «корней вулкана» или его резервуара (Лимонов, 2004) (Рис. 1).

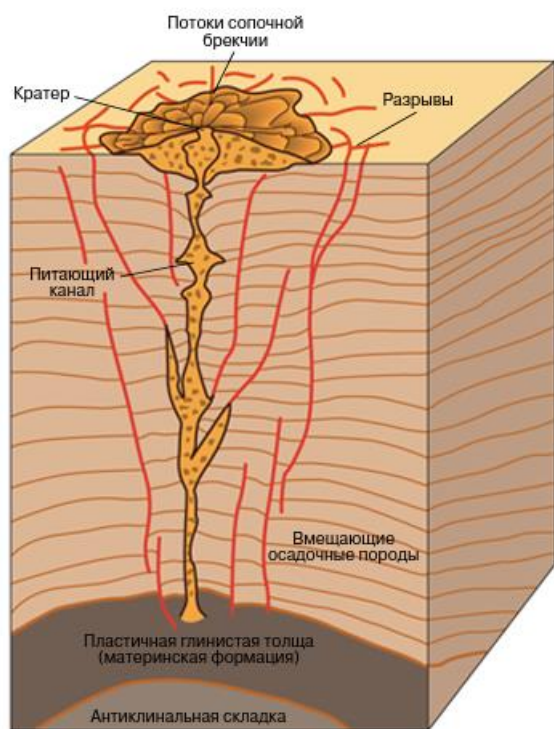


Рисунок 1. Схема строения грязевого вулкана (Лимонов, 2004).

Согласно геофизическим данным корни или очаги грязевых вулканов располагаются в стратисфере, т.е. в верхней части земной коры, состоящей из осадочных горных пород, на глубине 7-8 км от земной поверхности (Холодов, 2019). Однако есть данные о глубине заложения корней вулканов до 8-9 км, мощность же осадочного чехла в этом регионе превышает 20-25 км (Якубов и др., 1980; Рахманов, 1987; Гулиев и др., 1988). В литературных данных встречается также сообщение о том, что корни некоторых грязевых вулканов могут достигать 15 – 25 км (Mazzini, Etiope, 2017), однако этот факт является предметом дебатов и заслуживает более детальных геофизических исследований. Многие грязевые вулканы фиксируются в разрезе меловых и юрских отложений, а корни НГВ Карabetова гора зафиксированы на глубине до 15 км, что соответствует домезозойскому фундаменту (Шнюков, Нетребская, 2013).

Вмещающие породы в порядке уменьшения степени контактовых изменений располагаются в следующей последовательности: глины, глинистые

сланцы; карбонатные породы (известняки, доломиты); основные изверженные породы; вулканические туфы и туфогенные породы; песчаники, песчанистые породы, кремнистые породы.

В настоящее время известно о 2508 грязевых вулканах и грязевулканических образований в 42-х географических районах, таких как Альпийско-Гималайская, Тихоокеанская и Центральноазиатская складчатости, глубоководные зоны Каспия и Чёрное и Средиземное моря (Baloglanov et al., 2018). Однако эта цифра не является точной, и многие исследователи приводят разные оценки общего количества грязевых вулканов. Так, в более ранних работах фигурировала цифры от 600 до более, чем 700 грязевых вулканов (Якубов и др., 1980; Гнатенко и др., 1986), в то время как с развитием методов геологических исследований уже сообщалось о 1950 грязевулканических структурах (Dimitrov, 2002) и даже о нескольких тысячах (Лимонов, 2004). По утверждению Milkov и соавт., общее число только подводных грязевых вулканов колеблется от 1000 до 100000 (Milkov, 2000).

Такая приблизительность подсчётов обусловлена, в первую очередь, отсутствием строгого определения термина «грязевой вулкан». Так, географический энциклопедический словарь приводит такое определение: *«Грязевой вулкан – большой холм плоскоконической формы с воронкообразным кратером на вершине, из которого постоянно или с перерывами выделяются газ или вода (иногда с плёнками нефти), а также жидкая глина, которая, аккумулируясь, наращивает конус вулкана»* (Геологический словарь, 1973). Очевидно, что такое определение является весьма широким и допускает различную субъективную трактовку. Более того, подводные грязевые вулканы, составляющие большую часть грязевых вулканов планеты, для непосредственного наблюдения без использования специальных средств недоступны и обнаруживаются лишь по ряду косвенных признаков.

Более лаконичную формулировку приводит в своей монографии Шнюков и соавт. (Шнюков и др., 2005): *«Грязевой вулкан – это эруптивный аппарат*

газового вулканизма, выбросы которого (сопочная брекчия, вода, газы, твердые обломки) слагают чаще всего положительные формы рельефа, иногда, в зависимости от местных условий и консистенций сопочных выбросов, заполненные жидкой грязью впадины».

Известный исследователь грязевых вулканов Mazzini дает такое определение понятию грязевого вулканизма: *Mud volcanoes are surface expressions of focused fluid flow inside hydrocarbon-bearing sedimentary basins* (Грязевые вулканы представляют собой поверхностные проявления сосредоточенного течения флюидов внутри углеводородоносных осадочных бассейнов) (Mazzini, Etiope, 2017).

1.2.1. Распространение наземных грязевых вулканов

Наземные грязевые вулканы широко распространены во многих районах планеты Земля, как минимум в 26-ти странах Европы, Азии, Америки и Океании (Mazzini, Etiope, 2017). К настоящему моменту не известно ни об одном НГВ лишь на Африканском континенте.

Как правило, НГВ располагаются в нефтегазоносных районах, вдоль краёв зоны Тетиса, куда входит Альпийско-Карпато-Гималайский пояс, где плотность грязевых вулканов максимальна (Chao, You, Sun, 2010). К настоящему времени известно о более чем 1000 НГВ, сконцентрированных в нефтегазоносных бассейнах подвижных поясов Земли (Baloglanov et al., 2018). Они встречаются в Италии, Румынии, России, Грузии, Азербайджане, Туркмении, Пакистане, Индии и т.д. Наибольшая концентрация наземных грязевых вулканов наблюдается в Румынии (около 200 грязевулканических сооружений) (Mazzini, Etiope, 2017) и в Прикаспийской зоне, в Азербайджане, где закартировано более 220 грязевулканических структур (Алиев, 2006; Remizovschi et al., 2020). Ещё одной крупной грязевулканической провинцией, насчитывающей свыше 100 наземных грязевых вулканов, являются Северо-Западная часть Западно-Кубанской впадины, Таманский и Керченский полуострова (Лаврушин, 2012; Холодов, 2002, 2012; Шнюков и др., 2017). В

Италии идентифицировано 87 структур НГВ, большинство из которых представлено небольшими грязевыми конусами (Martinelli et al., 2012).

1.3. Значение наземных грязевых вулканов

Грязевой вулканизм – важный объект изучения, представляющий большой научный и практический интерес. Анализ продуктов деятельности наземных грязевых вулканов имеет большое значение при выяснении генезиса углеводородных скоплений в осадочной толще земной коры, оценке перспектив нефтегазоносности еще не вскрытых бурением отложений, определении состава флюидов и вмещающих пород, а также степени и характера насыщенности их различными полезными ископаемыми.

В настоящее время все большую актуальность приобретают исследования, связанные с вкладом НГВ в изменение климата, вызываемое глобальным потеплением. Грязевые вулканы - один из основных источников атмосферного метана (Etiope, Klusman, 2002), являющегося сильным парниковым газом. Из геологических источников ежегодно выбрасывается около 60 млн т метана, 25-30 % которого приходится на НГВ (Mazzini, Etiope, 2017). После водно-болотных угодий геологические выбросы являются вторым по важности природным источником метана, занимая около 10% общих выбросов метана из антропогенных и природных источников (Ciais et al., 2013). Выделение газа из НГВ идет не только через кратеры или видимые отверстия, но и посредством диффузной дегазации через почвы (Mazzini, Etiope, 2017). Один большой грязевой вулкан, состоящий из единичных или нескольких жерл, может выделять сотни тонн метана в год, а при извержении наземных грязевых вулканов всего за несколько часов может выделяться тысячи тонн газа (Гарькуша, 2019).

1.4. Микробные сообщества наземных грязевых вулканов

Микробные сообщества подводных грязевых вулканов изучались сравнительно широко, Наиболее изученным микробиологами морским грязевым вулканом является Хаакон Мосби (Норвежское море) который характеризуется высоким потоком метана, наличием газогидратов и аутигенных карбонатов Его бактериальное и архейное сообщество исследовалось неоднократно и каждый раз было показано значительное присутствие аэробных и анаэробных микроорганизмов (Niemann et al., 2006). Изучению микробных сообществ наземных грязевых вулканов посвящено меньшее количество работ.

Первое детальное исследование состава микробного сообщества наземного грязевого вулкана было выполнено для Сан-Бьяджо-Бельпассо (вулкан Этна, Италия) в 2002 году (Yakimov et al., 2002). В ходе выполнения работы в чистые культуры были выделены представители родов *Halomonas*, *Marinobacter* и *Fundibacter*, а представители филума *Proteobacteria*, согласно данным молекулярного исследования, являлись доминирующей группой микробного сообщества (Yakimov et al., 2002). Впрочем, согласно Mazzini & Etiope (Mazzini, Etiope, 2017) данное местообитание представляет собой геотермальную систему, размещенную в осадочных породах, которые внешне имеют значительное сходство с грязевым вулканом и могут быть ошибочно к ним отнесены.

После этого молекулярными методами были исследованы микробные сообщества НГВ Паклеле-Мичи (Румыния) (Alain et al., 2006); Перекишкюль, Борансыз-Джувльга, Дашгиль и Бахар (Азербайджан) (Green-Saxena et al., 2012); Shin-Yan-Ny-Hu (Тайвань) (Cheng et al., 2012); Усу (Китай) (Yang et al., 2012b); природного заповедника Сальсе ди Нирано, Фиорано (Италия) (Wrede et al., 2012); Муруно (Япония) (Miyake et al., 2023); Dushanzi (Китай) (Zhiyong Huang1 et al., 2016); Baiyanggou (Китай) (Zhiyong Huang1 et al., 2016); Lei-Gong-Hou (Тайвань) (Tu et al., 2017); Гомышан (Иран) (Ghiasian et al., 2017); Ain (Иран) (Sepanian, Sepahy, Hosseini, 2018); Андаман и Никобар (Индия) (Manna et al.,

2021; Venkadesaperumal, Amaresan, Kumar, 2014); Булганак (РФ) (Mardanov et al., 2020); Карабетова гора (РФ) (Merkel et al., 2021) и Niao Song (Тайвань) (Hsu et al., 2021). Данные по исследованиям наземных грязевых вулканов молекулярными методами приведены в Таблице 1.

С помощью профилирования фрагментов гена 16S рНК микробного сообщества НГВ было показано, что архейная составляющая представлена по большей части метаногенами и анаэробными метанотрофными археями (ANME), бактериальная же составляющая значительно более разнообразна и включает в себя представителей различных филумов.

Представители филума *Deltaproteobacteria* (“*Desulfobacterota*”), к которым относятся многие сульфатвосстанавливающие микроорганизмы, были обнаружены во всех исследованных НГВ (Alain et al., 2006; Cheng et al., 2012; Lin et al., 2018; Ren et al., 2018; Schulze-Makuch et al., 2020; Tu et al., 2017). Сульфатвосстанавливающие бактерии могут образовывать синтрофные консорциумы с ANME, осуществляющими анаэробное окисление метана (АОМ) (Niemann et al., 2006), которое, впрочем, может сочетаться с восстановлением железа, марганца, нитритов и нитратов (Raghoebarsing et al., 2006). Таким образом, состав как архейных, так и бактериальных сообществ, вероятно, зависит от наличия и концентрации потенциальных акцепторов электронов в конкретном местообитании (Ren et al., 2018; Tu et al., 2017).

Первая работа по исследованию изменению состава микробного сообщества после извержения НГВ была опубликована в 2021 году. Так, сразу после извержения представители филумов *Proteobacteria* (50 %) и *Desulfobacterota* (40 %) были представлены практически в одинаковом соотношении, в то время, как представители филума *Firmicutes* составляли лишь 10%. Спустя 418 дней представители филума *Desulfobacterota*, находившиеся ранее в доминирующей позиции, уже не детектировались. 65 % всего бактериального компонента составляли представители филума *Proteobacteria*, а 35% - *Firmicutes* (Hsu et al., 2021).

Таблица 1. Исследования микробных сообществ наземных грязевых вулканов*.

Локация НГВ, литературный источник	Численность, метод	Измеренные активности	pH	Разнообразие молекулярными методами	Выделение чистых культур	Примечание
Паклеле Мичи, Карпаты; Румыния (Alain et al., 2006)	10 ⁸ кл/г (бактерии) 10 ⁶ кл/г (археи) qPCR	Аэробное окисление метана, анаэробное окисление метана, метаногенез, сульфатредукция 20 °C	7,8	76 архейных и 75 бактериальных клонов ANME-2, <i>Methanomicrobiales</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Planctomyces</i>	<i>Desulfovibrio</i>	Впервые детектированы представители ANME в наземных местообитаниях
Перекишкюль, Борансыз-Джюльга, Дашгиль и Бахар; Азербайджан (Green-Saxena et al., 2012)	10 ⁷ – 10 ⁹ кл/г (бактерии) 10 ⁷ – 10 ⁸ кл/г (археи) qPCR	Сульфатредукция 60 °C	Н.д.	74 бактериальных клона <i>Epsilonproteobacteria</i> (59 %), <i>Chloroflexi</i> (19 %), <i>Deltaproteobacteria</i> (9 %), <i>Firmicutes</i> (5 %), <i>Bacteroidetes</i> (3 %)	Нет	Потенциальный транспорт термофильных микроорганизмов, осуществляющих цикл серы, из глубинных местообитаний
Shin-Yan-Ny-Hu; Тайвань	Нет данных	Аэробное окисление метана, метаногенез, сульфатредукция	8,36	402 архейных и 668 бактериальных сиквенса <i>Methanosaeta thermofila</i>	Нет	Детектировано присутствие термофильных микроорганизмов в НГВ

Таблица 1. (продолжение)

(Cheng et al., 2012)		20 °C		(40 %), <i>Thermodesulfobacterium</i> sp. (13 %), <i>Pelotomaculum</i> sp. (12 %), <i>Syntrophohabdus</i> sp. (11 %)		
Усу; Китай (Yang et al., 2012b)	Нет данных RFLP	Нет	9,0	100 бактериальных и 100 архейных клонов <i>Proteobacteria</i> (79 %), <i>Actinobacteria</i> (15%), <i>Fusobacteria</i> (6 %) <i>Euryarchaeota</i> (88 %), <i>Crenarchaeota</i> (12 %)	Нет	40 % бактериальных клонов связаны с микроорганизмами, выделенными из морских экосистем. 96 % архейных клонов связаны с представителями подводных ГВ щёлочно-солёных озёр. Подобная закономерность прослеживается для НГВ Сан-Бьяджо Бельпасса и Паклеле Мичи
Природный заповедник Сальседо Нирано, Фиорано; Италия (Kokoschka et al., 2015; Wrede et al., 2012)	10 ⁶ кл/мл FISH	Анаэробное окисление метана	7,8	<i>Crenarchaeote</i> (68 %), ANME-2a-2b (14 %), GOM Arc 1 (7 %), ANME-1 (1 %)	2 изолята <i>Desulfobacterium</i> , <i>Clostridium</i>	Выделение чистых культур было направлено на изучение группы сульфатредукторов, а изучение микробного состава молекулярными методами – на аэробное и анаэробное окисление метана.

Таблица 1. (продолжение)

<p>Dushanzi; Китай (Huang et al., 2016)</p>	<p>Нет данных PCR, cloning</p>	<p>Нет</p>	<p>Н.д.</p>	<p>38 архейных и 135 бактериальных клонов <i>Euryarchaeota</i> (46 %), <i>Thaumarchaeota</i> (3 %), <i>Crenarchaeote</i> (28 %) <i>Gamma</i>proteobacteria (62 %), <i>Alphaproteobacteria</i> (25 %), <i>Deltaproteobacteria</i> (11 %), <i>Bacteroidetes</i> (2 %)</p>	<p>Нет</p>	<p>Проанализированы микробные сообщества двух НГВ Джунгарского бассейна (Китай). Сообщается о неклассифицируемой археи, возможно, являющейся представителем нового филума.</p>
<p>Baiyanggou; Китай (Huang et al., 2016)</p>	<p>Нет данных PCR, cloning</p>	<p>Нет</p>	<p>Н.д.</p>	<p>83 архейных и 351 бактериальный клон <i>Euryarchaeota</i> (89 %), <i>Thaumarchaeota</i> (11 %) <i>Gamma</i>proteobacteria (42 %), <i>Bacteroidetes</i> (32 %), <i>Actinobacteria</i> (6 %)</p>	<p>Нет</p>	

Таблица 1. (продолжение)

<p>Lei-Gong-Hou; Тайвань</p> <p>(Tu et al., 2017)</p>	<p>$10^5 - 10^7$ кл/г (бактерии) $10^5 - 10^8$ кл/г (археи)</p> <p>qPCR</p>	<p>Различные акцепторы электронов (SO_4^{2-}, NO_3^-, FeOx, AQDS, фумарат)</p>	<p>Н.д.</p>	<p><i>Proteobacteria</i>, <i>Euryarchaeota</i>, <i>Chloroflexi</i>, <i>Firmicutes</i>, <i>Bacteroidetes</i>, <i>Acidobacteria</i> (79 %)</p> <p><i>Planctomycetes</i>, <i>Actinobacteria</i>, <i>Lentisphaerae</i>, <i>OP8</i>, <i>Thaumarchaeota</i>, <i>JS1</i>, <i>Spirochaetes</i>, <i>OD1</i> (7 %)</p>	<p>Нет</p>	<p>За счет присутствия в микробном сообществе <i>Chloroflexi</i>, <i>Firmicutes</i>, <i>Bacteroidetes</i> обеспечивается деградация сложных органических веществ и их последующее сбраживание. В дальнейшем продукты брожения разлагаются метаногенами.</p>
<p>Гомышан; Иран</p> <p>(Ghiasian et al., 2017)</p>	<p>10^1 кл/мл</p> <p>DAPI, FISH, DGGE</p>	<p>Нет</p>	<p>8,0</p>	<p><i>Rahnella</i> (75 %), <i>Serratia</i> (25 %) (определено методом DGGE)</p>	<p>122 изолята</p> <p><i>Halomonas</i> (20 %), <i>Arthrobacter</i> (5 %), <i>Kocuria</i> (5%), <i>Thalassobacillus</i> (5 %), <i>Marinobacter</i> (20 %), <i>Paracoccus</i> (5 %), <i>Roseovarius</i> (5 %), <i>Jeotgallibacillus</i> (5 %), <i>Bacillus</i> (15 %), <i>Staphylococcus</i> (15 %)</p>	<p>Соотношение архейного компонента к бактериальному методом FISH составило 1:5</p>
<p>Ain; Иран</p>	<p>Нет данных</p>	<p>Нет</p>	<p>Н.д.</p>	<p><i>Proteobacteria</i>, <i>Actinobacteria</i>, <i>Firmicutes</i></p>	<p>13 изолятов</p>	<p>Работа фокусировалась исключительно на бактериальном компоненте. Архейное</p>

Таблица 1. (продолжение)

(Sepanian, Sepahy, Hosseini, 2018)	PCR				<i>Kocuria, Brevibacterium, Planomicrobium, Dietzia, Marinobacter, Stenotrophomonas, Nitrincola</i>	сообщество не изучалось.
Андаман, Никобар; Индия (Manna et al., 2021; Venkadesaperumal, Amaresan, Kumar, 2014)	Нет данных PCR	Нет	Н.д.	<i>Proteobacteria</i> (48 %), <i>Firmicutes</i> (28 %), <i>Actinobacteris</i> (24 %)	52 изолята (Venkadesaperumal, Amaresan, Kumar, 2014) <i>Enterobacter, Pseudomonas, Exiguobacterium, Pantoea</i> 29 изолятов (Manna и др, 2021) <i>Bacillus, Brevibacillus, Clostridium, Kocuria, Curtobacterium, Microbacterium, Methylobacterium, Lutibaculum, Luteimonas, Halomonas,</i>	Работа фокусировалась исключительно на бактериальном компоненте. Архейное сообщество не изучалось.

Таблица 1. (продолжение)

					<i>Pseudomonas, Acinetobacter</i>	
Булганак; РФ (Mardanov et al., 2020)	Нет данных PCR	Нет	7,43	82 023 прочтения: бактерии (79.7 %), археи (19.1 %) <i>Campylobacterota</i> (35,1 %), <i>Gamma</i> proteobacteria (34,6 %), <i>Alphaproteobacteria</i> (2,4 %) <i>Ca</i> Bathyarchaeota (9,5 %), <i>Euryarchaeota</i> (7,5 %), <i>Ca</i> Hadesarchaea (2,5 %)	Нет	Впервые проанализировано микробное сообщество НГВ на территории РФ
Карabetова гора, Краснодарский край; РФ (Merkel et al., 2021)	qPCR	Анаэробное окисление метана	8,0	Археи (51 %), бактерии (49 %) ANME-3 (39 %), ANME-2a-2b (4 %), DSEG (4 %), Woesearchaeota (2 %) <i>Proteobacteria</i> (21 %), <i>Chloroflexi</i> (9 %),	<i>Perlabentimonas, Alcalibaculum, Pelovirga</i>	Впервые проанализирован геном ANME-3

Таблица 1. (продолжение)

				<i>Bacteroidetes</i> (4 %), <i>Actinobacteria</i> (4 %), <i>Firmicutes</i> (3 %), <i>Cyanobacteria</i> (3 %)		
Niaosong; Тайвань (Hsu et al., 2021)	Нет данных PCR	Нет	7,53 – 8,42	<p>День 1: <i>Proteobacteria</i> (50 %), <i>Firmicutes</i> (10 %), <i>Desulfobacterota</i> (40 %)</p> <p>День 4: <i>Proteobacteria</i> (95 %), <i>Firmicutes</i> (5 %)</p> <p>День 8: <i>Proteobacteria</i> (85 %), <i>Firmicutes</i> (5 %), <i>Desulfobacterota</i> (10 %)</p> <p>День 22: <i>Proteobacteria</i> (35 %), <i>Firmicutes</i> (45 %), <i>Desulfobacterota</i> (1 %) + другие филумы</p>	Нет	<p>Впервые проанализирован состав микробного сообщества спустя различное время (от 1 до 418 дней) после извержения НГВ. Архейный компонент не изучался.</p>

Таблица 1. (продолжение)

			<p>День 96: <i>Proteobacteria</i> (55 %), <i>Firmicutes</i> (45 %)</p> <p>День 158: <i>Proteobacteria</i> (25 %), <i>Firmicutes</i> (15 %), <i>Desulfobacterota</i> (10 %) + другие филумы</p> <p>День 418: <i>Proteobacteria</i> (65 %), <i>Firmicutes</i> (35 %)</p>		
--	--	--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--

*Приведены литературные данные на 1.6.2023

1.4.1. Новые таксоны микроорганизмов, выделенные из наземных грязевых вулканов

В ряде работ, помимо изучения микробного разнообразия НГВ молекулярными методами, использовались также и традиционные микробиологические методы, включающие в себя выделение чистых культур микроорганизмов различных физиологических групп и, в случае принадлежности их к каким-либо новым таксонам, описании. Число их сравнительно невелико: к моменту написания работы известно лишь о 18 микроорганизмах – представителях новых таксонов различного порядка (Табл. 2).

Несмотря на то, что практически все новые изоляты были выделены из НГВ, чье микробное сообщество не изучалось с помощью молекулярных методов, ряд микроорганизмов детектировался в бактериальном компоненте одного или нескольких НГВ. Интересно, что многие микроорганизмы при этом являются алкалотолерантными или даже алкалофильными, имея оптимум роста около 9,0. За исключением умеренно термофильной бактерии *Pelomicrobium methylotropicum* (Slobodkina et al., 2020) и термофильной бактерии *Geobacillus toebii* (Dhaker et al., 2011), все остальные изоляты являются мезофилами, имея температурный оптимум около 30°C, что соотносится с температурными характеристиками НГВ. Физиология изолятов указывает на их возможное участие в биогеохимических циклах серы, азота и метана. Примечательно, что анаэробные представители наземных грязевых вулканов были впервые выделены в чистые культуры сотрудниками лаборатории разнообразия и экологии экстремофильных микроорганизмов Института микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН.

К настоящему моменту литературные данные о выделении новых таксонов архей из наземных грязевых вулканов отсутствуют.

Таблица 2. Таксономическое положение, краткая физиологическая характеристика и местообитание новых таксонов микроорганизмов, выделенных в чистые культуры из наземных грязевых вулканов.

Организм	Таксономическое положение*	Источник выделения, наземный грязевой вулкан	Физиология		Литературный источник
			Оптимумы	Отношение к кислороду	
<i>Belliella pelovolcani</i> KCTC 13248	<i>Bacteroidota / Cytophagia</i>	Вандань, Пинтун, Тайвань	37 °С, pH 8,0	Аэроб	(Arun et al., 2009)
<i>Geobacillus toebii</i> strain RH127 DSM 4590	<i>Bacillota / Bacilli</i>	О-в Баратанг, архипелаг Средний Андаман, Индия	65 °С, pH 7,5	Аэроб	(Dhaker et al., 2011)
<i>Cesiribacter andamanensis</i> DSM 22818	<i>Bacteroidota / Cytophagia</i>		30 - 37 °С, pH 7,5	Аэроб	(Srinivas et al., 2011)
<i>Lutibaculum baratangense</i> KCTC 22669	<i>Pseudomonadota / Alphaproteobacteria</i>		30 - 37 °С, pH 8,0	Аэроб	(Kumar et al., 2012)
<i>Aquipuribacter nitratireducens</i> DSM 22863	<i>Actinomycetota / Actinobacteria</i>		37 °С, pH 7,5	Аэроб	(Srinivas et al., 2015)

Таблица 2. (продолжение)

<i>Sulfurimonas crateris</i> DSM 109248	<i>Pseudomonadota</i> <i>/Epsilonproteobacteria</i>	Кучугур, Тамань, Краснодарский край, РФ	30 °С, pH 8,0	Анаэроб	(Ratnikova et al., 2020)
<i>Sedimenticola hydrogenitrophicus</i> KCTC 25568	<i>Pseudomonadota</i> / <i>Gammaproteobacteria</i>		30 °С, pH 7,5	Факультативный анаэроб	(Slobodkina et al., 2023)
<i>Pelomicrobium methylophilum</i> KCTC 62861	<i>Pseudomonadota</i> / <i>Hydrogenophilalia</i>	Гнилая гора, Тамань, Краснодарский край, РФ	50 °С, pH 8,5	Анаэроб	(Slobodkina et al., 2020)
<i>Pseudodesulfovibrio alkaliphilus</i> KCTC 15918	<i>Pseudomonadota</i> / <i>Deltaproteobacteria</i>		24 °С, pH 9,5	Анаэроб	(Frolova et al., 2021b)
<i>Anaerotalea alkaliphila</i> KCTC 15917	<i>Bacillota</i> / <i>Clostridia</i>		37 °С, pH 9,0	Анаэроб	(Frolova et al., 2021a)
<i>Sulfurospirillum tamanensis</i> DSM 112596	<i>Pseudomonadota</i> <i>/Epsilonproteobacteria</i>		30 °С, pH 9,0	Факультативный анаэроб (до 3% O ₂)	(Фролова и др., 2023a)
<i>Roseovarius autotrophicus</i> KCTC 15916	<i>Pseudomonadota</i> <i>/Alphaproteobacteria</i>		30 °С, pH 8,0	Факультативный анаэроб	(Slobodkina et al., 2022)

Таблица 2. (продолжение)

<i>Desulfobotulus pelophilus</i> DSM 112796	<i>Pseudomonadota / Deltaproteobacteria</i>	Гнилая гора, Тамань, Краснодарский край, РФ	37 °С, pH 9,5	Анаэроб	(Фролова и др., 2023b)
<i>Petrocella pelovolcania</i> DSM 113898	<i>Bacillota / Clostridia</i>		30 °С, pH 9,0	Анаэроб	(Frolova et al., в печати)
<i>Alkalibaculum sporogenes</i> KCTC 15840	<i>Bacillota / Clostridia</i>	Карабетова гора, Тамань, Краснодарский край, РФ	30 °С, pH 8,0	Облигатный анаэроб	(Khomyakova et al., 2020)
<i>Pelovirga terrestris</i> KCTC 1519	<i>Pseudomonadota / Deltaproteobacteria</i>		30 °С, pH 8,5 – 9,0	Анаэроб	(Khomyakova et al., 2022)
<i>Desulfatitalea alkaliphila</i> KCTC 25382	<i>Pseudomonadota / Deltaproteobacteria</i>		30 °С, pH 8,5 – 9,0	Анаэроб	(Khomyakova et al., 2023)
<i>Perlabentimonas gracilis</i> DSM 110720	<i>Bacteroidota / Bacteroidia</i>		37 °С, pH 7,5 – 8,0	Анаэроб	(Khomyakova et al., 2021)

*Приведены литературные данные на 1.6.2023

ГЛАВА 2. АЛКАЛОФИЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

2.1. Определение и общие сведения об алкалофильных микроорганизма

В настоящее время существует несколько определений понятия «алкалофил». Так, пионер в области изучения алкалофильных микроорганизмов проф. Хорикоши даёт такое определение: *"alkaliphile" is used for microorganisms that grow optimally or very well at pH values above 9 but cannot grow or grow only slowly at the near-neutral pH value of 6.5* (Алкалофилы - это микроорганизмы, которые оптимально или очень хорошо растут при рН среды около 9 и которые не способны расти или очень медленно растут при околонеutralных значениях рН около 6,5) (Horikoshi, 1999). В своей более поздней работе проф. Хорикоши уточняет определение: *bacteria with pH optima for growth in excess of pH 8, usually pH 9–12, are defined as alkaliphilic bacteria* (Бактерии с оптимумом роста рН выше 8, обычно 9 – 12 являются алкалофильными бактериями) (Horikoshi, 2011).

Существуют и другие определения и классификации алкалофильных микроорганизмов. Как, например: *Alkaliphile: an organism with optimal growth at pH values above 10* (Алкалофил – организм с оптимальным ростом при значениях рН выше 10) (Etiope, Klusman, 2002; Horikoshi, Bull, 2011). Другие авторы делят микроорганизмы, живущие в щелочных условиях, на *алкалотолерантных* (оптимальный рН для них составляет 7,0 – 9,0 и они не способны жить при значениях рН выше 9,5) и *алкалофильных* (для них оптимальный рН составляет 10,0 – 12,0), которые, в свою очередь, подразделяются на *факультативных алкалофилов* (оптимальное значение рН 10.0 или выше, но способны расти и при нейтральных значениях) и *облигатных алкалофилов* (оптимальное значение рН 10.0 или выше и не способны расти при рН ниже 8,5 – 9,0) (Krulwich, Guffanti, 1989). При написании данной работы мы считали алкалофильными микроорганизмы с оптимумом роста 9.0 или выше.

Детальное изучение алкалофильных микроорганизмов было начато во второй половине XX века (Preiss et al., 2015). Известный советский и российский микробиолог Г.А. Заварзин отмечал, что анаэробные алкалофильные микроорганизмы в силу ряда причин – прежде всего определенных трудностей работы с облигатными анаэробами – оставались до последнего времени вне зоны внимания микробиологов (Заварзин, 2007). Г.А. Заварзин, изучая масштабы образования внутриконтинентальных содовых озер, дополнил гипотезу «содового океана» С. Кепмпе и Е. Дегенса и предположил, что щелочные водоемы могли служить центрами возникновения микробного разнообразия на «содовом континенте». В отличие от «содового океана» для «содового континента» характерно субаэральное углекислотное выщелачивание силикатных пород, приведшее к связыванию CO_2 в карбонаты (Заварзин, 1993). Значительный вклад в современные представления о биоразнообразии алкалофилов внесли работы Т.Н. Жилиной и Д.Ю. Сорокина. Интересно, что многие истинно алкалофильные микроорганизмы, в том числе и некоторые облигатные алкалофилы, были выделены из садовых почв или из других неэкстремофильных местообитаний, что позволяет предположить присутствие в этих источниках особых экологических ниш, обеспечивающих необходимые условия для существования алкалофильных микроорганизмов (Horikoshi, 2004).

Основную адаптацию клетки к росту в щелочных средах обеспечивают протонные и натриевые насосы (Dhakar, Pandey, 2016; Khan, Ivey, Krulwich, 1992). К другим адаптационным особенностям алкалофильных микроорганизмов можно отнести: (1) буферные системы клеточной цитоплазмы обеспечивающие содержание в ней нуклеиновых кислот, белков, пулы глутамата и полиаминов. При нейтральных значениях pH буферную емкость обеспечивают фосфатные группы ДНК и РНК, а в щелочных или кислых диапазонах pH – основные или боковые цепи кислых аминокислот,

входящих в состав белков; (2) ферменты, секретирующиеся в окружающую среду или находящиеся на поверхности клетки, и обладающие устойчивостью к денатурирующему действию высокощелочной среды; (3) цитоплазматическую мембрану обладающую низкой проницаемостью для протонов и других ионов (Slonczewski, Foster 1996).

2.2. Местообитания алкалофильных микроорганизмов

Алкалофильные микроорганизмы состоят из двух физиологических групп: алкалофилов, которым для оптимального роста требуется рН среды от 9,0 и выше, и галоалкалофилов, которым помимо щелочных значений рН требуется также высокая концентрация NaCl (до 33% (вес/объем)).

Алкалофилы могут быть выделены из образцов с нейтральными, а иногда даже кислыми значениями рН. Они могут как сосуществовать с нейтрофильными микроорганизмами, так и являться преобладающей группой в тех или иных экстремофильных местообитаниях (Horikoshi, 1999). Например, изучение микробного разнообразия Марианской впадины показало присутствие аэробных алкалофилов в глубоководных отложениях, собранных с глубины до 10898 м (Takami et al., 1997).

Галоалкалофильные микроорганизмы в основном детектируются в гиперщелочных и одновременно соленых местообитаниях, таких как, например, содовые озера, которые образуются в закрытых водосборных бассейнах, подверженных высокой скорости углекислотного выветривания (Заварзин, 2000; Заварзин, 2007). Для химического состава воды содовых озер характерен дефицит ионов магния и кальция одновременно с повышенной концентрацией в ней карбонатов и хлоридов, что обеспечивает значения рН среды в диапазоне от 8,0 до 12,0. В аэробных и анаэробных микробных сообществах содовых озер в основном идентифицированы микроорганизмы, имеющие отношение к циклу углерода или серы (Jones, Grant, 2000).

Мировой океан, имеющий слабощелочную среду с рН около 8,3, является ареалом обитания алкалофильных и алкалотолерантных микроорганизмов, например, представителей родов *Oceanobacillus* и *Alkalibacterium* (Ishikawa et al., 2011; Kim et al., 2007).

Щелочные (солончаковые) почвы в отличие от щелочных озер или морских вод отличаются сложным химическим составом, который зависит от геологического фона, микробиоты и климатических особенностей местности. Щелочные значения рН обеспечиваются высоким содержанием в почвах хлоридов и карбонатов. Солончаковые почвы расположены в аридных зонах юга Сибири (сухие степи), северо-восточной Монголии, северного Китая, Египта, Индии, Пакистана, Венгрии, Аргентины и североамериканских прерий (Kevbrin, 2020). Метагеномные исследования прибрежных почв штата Гуджарат (Индия) детектировали представителей филумов *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* и *Planctomycetes* в солено-щелочных почвах с рН 9,5 (Keshri, Mishra, Jha, 2013).

Сравнительно недавно с помощью молекулярных и классических микробиологических методов было исследовано новое потенциальное обитание алкалофильных микроорганизмов – колонны туфа икаита (фьорды Икка, Гренландия), характеризующиеся высокощелочным рН (10,4), низкой температурой (4 °С) и низкой соленостью (0,9 %). Представители филумов *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Planctomycetes* и *Proteobacteria* детектировались в природных образцах колонны туфа икаита (Schmidt, Priemé, Stougaard, 2006b; Stougaard et al., 2002; Trampe et al., 2017).

Деятельность человека также может приводить к формированию щелочной среды, подходящей для обитания экстремофильных микроорганизмов. Так, были проанализированы микробные сообщества озера Калумет (Чикаго, США), содового шламохранилища (г. Яниково, Польша) или алюминиевые производства (Индия), где детектировались

представители филумов *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Actinobacteria* (Kalwasińska et al., 2017; Kevbrin, 2020; Krishna, Babu, Reddy, 2014; Roadcap et al., 2006).

2.3 Алкалофильные сульфатвосстанавливающие бактерии

Сульфатвосстанавливающие бактерии – физиологическая группа микроорганизмов, способная получать энергию в анаэробных условиях за счет сульфатного дыхания, восстанавливая использующийся в качестве акцептора электронов сульфат до сульфида. В большинстве экосистем, сульфатредукторы, являются микроорганизмами, осуществляющими заключительные этапы разложения органического вещества.

Деятельность сульфатвосстанавливающих микроорганизмов признается дополнительным биогенным фактором создания щелочности в содовых озерах и, вероятно, других алкалофильных местообитаний (Kevbrin, 2020).

2.3.1. Филогенетическое разнообразие алкалофильных сульфатвосстанавливающих бактерий

Сульфатвосстанавливающие микроорганизмы являются самой малочисленной физиологической группой среди алкалофилов. Первой алкалофильной сульфатвосстанавливающей бактерией стала *Desulfonatrovibrio hydrogenovorans*, выделенная в 1997 году из содового озера Магади (Кения) (Zhilina et al., 1997). С тех пор было выделено в чистую культуру и описано около десятка алкалофильных сульфатвосстанавливающих микроорганизмов, относящимся к двум филумам: *Pseudomonadota* и *Bacillota*. Алкалофильные сульфатредукторы филума *Pseudomonadota* представлены семействами *Desulfobacteraceae*, *Desulfobulbaceae*, *Desulfohalobiaceae*, *Desulfonatronoaceae* и *Desulfovibrionaceae*, а представители филума *Bacillota* относятся к семейству *Peptococcaceae* (Таблица 3).

Таблица 3. Таксономическое разнообразие алкалофильных сульфатвосстанавливающих микроорганизмов.

Филум	Семейство	Род
<i>Bacillota</i>	<i>Peptococcaceae</i>	<i>Desulfofalx</i> , <i>Desulfotomaculum</i>
<i>Pseudomonadota</i>	<i>Desulfobacteraceae</i>	<i>Desulfobotulus</i> , <i>Desulfonatronobacter</i>
	<i>Desulfobulbaceae</i>	<i>Desulfobulbus</i>
	<i>Desulfovibrionaceae</i>	<i>Desulfohalovibrio</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Pseudodesulfovibrio</i>
	<i>Desulfohalobiaceae</i>	<i>Desulfonatronospira</i> , <i>Desulfonatronovibrio</i>
	<i>Desulfonatronaceae</i>	<i>Desulfonatronum</i>

2.3.2. Физиологическое разнообразие алкалофильных сульфатвосстанавливающих бактерий

Практически все алкалофильные сульфатвосстанавливающие микроорганизмами являются мезофиллами с температурным оптимумом роста около 30 - 35 °С. К моменту написания работы единственным умеренно термофильным алкалофильным сульфатредуктором является *Desulfotomaculum alkaliphilum*, растущая с оптимальной скоростью при 50 – 55 °С (Pikuta et al., 2000a). Оптимальным рН для большинства алкалофильных сульфатредукторов является 9,0. Многие изоляты являются галотолерантными или галофильными микроорганизмами.

Водород и формиат в присутствии ацетата в качестве источника углерода используются практически всеми алкалофильными сульфатредукторами в качестве доноров электронов. Многие изоляты в качестве доноров электронов используют лактат, пируват и этанол, а

представители родов *Desulfobotulus* и *Desulfonatronobacter* в качестве доноров электронов используют различные жирные кислоты (Таблица 4).

2.3.3. Экологическое разнообразие алкалофильных сульфатвосстанавливающих бактерий

Основным ареалом обитания алкалофильных сульфатвосстанавливающих микроорганизмов являются содовые озера, значительная часть которых помимо высоких значений рН отличается также и высокой соленостью воды. Большое количество алкалофильных сульфатредукторов было выделено в чистую культуру в ходе изучения микробного разнообразия содовых озер России, Мексики, США, Кении и Индии.

Наземные грязевые вулканы, судя по информации, полученной в результате профилирования 16S рРНК микробного сообщества, также являются местом обитания алкалофильных сульфатредукторов.

Из антропогенных местообитаний к настоящему времени выделено лишь два алкалофильных сульфатредуктора: из биореактора Тиопак (Нидерланды) – *Desulfonatronum alkalitolerans* (Sorokin, Tourova, Muyzer, 2013) и из реактора теплоцентрали в Дании – *Desulfohalovibrio alkalitolerans* (Abildgaard et al., 2006). Интересно, что все остальные алкалофильные сульфатвосстанавливающие представители рода *Desulfonatronum* были выделены из содовых озер, а род *Desulfohalovibrio* в настоящее время насчитывает лишь один алкалофильный микроорганизм, другой же его представитель является нейтрофилом, имея оптимальный рН 7,5 (Spring et al., 2019) (Таблица 4).

Таблица 4. Физиологическое разнообразие алкалофильных сульфатвосстанавливающих микроорганизмов*

Микроорганизм	Источник выделения	Условия культивирования		Используемые доноры электронов с SO_4^{2-}	Ссылка
		Т, °С (опт)	рН (опт)		
<i>Desulfobotulus alkaliphilus</i>	Содовое озеро, Кулундинская равнина, Алтай, Россия	До 40 (32)	8,7 – 10,7 (10,0 – 10,5)	Бутират, капроат, каприлат, наноат	(Sorokin, Detkova, Muyzer, 2010)
<i>Desulfobotulus mexicanus</i>	Щелочное кратерное озеро Гуанахуато, Мексика	15 – 37 (32)	8,3 – 10,1 (9,0 – 9,6)	Пируват, бутират, жирные кислоты (C_4 – C_{18})	(Pérez-Bernal et al., 2020)
<i>Desulfobotulus pelophilus</i>	Наземный грязевой вулкан, Краснодарский край, Россия	14 – 42 (37)	8,5 – 10,5 (9,5)	Пируват, лактат, бутират, капроат, каприлат и пеларгонат	(Фролова и др., 2023b)
<i>Desulfobulbus alkaliphilus</i>	Содовое озеро Кулундинская равнина, Алтай, Россия	До 37 (33)	8,2 – 10,2 (9,4)	Пропионат, пируват	(Sorokin et al., 2012)
<i>Desulfofalx alkaliphila</i>	Свино-коровий навоз	30 – 58 (50 – 55)	8,0 – 9,5 (8,6 – 8,7)	H_2^{**} , формиат ^{**} , пируват, лактат, этанол	(Pikuta et al., 2000a)

Таблица 4. (продолжение)

<i>Desulfohalovibrio alkalitolerans</i>	Реактор теплоцентрали, Дания	16 – 47 43	6,9 – 9,9 (9,0-9,4)	H ₂ ^{**} , формиат ^{**} , пируват, лактат	(Abildgaard et al., 2006)
<i>Desulfonatronobacter acetoxydans</i>	Гиперсоленое озеро Горькое-1, Россия	До 43 (37 – 40)	8,0 – 10,1 (9,5)	Пируват, бутират, лактат, этанол, пропанол, бутанол, жирные кислоты (C ₃ – C ₉)	(Sorokin et al., 2012b)
<i>Desulfonatronospira sulfatiphila</i>	Гиперсоленое озеро Горькое-1, Россия	До 40 (33 – 35)	9,0 – 10,3 (9,7 – 10,0)	Формиат ^{**} , этанол, бутанол, лактат, пируват	(Sorokin, Chernyh, 2017)
<i>Desulfonatronovibrio hydrogenovorans</i>	Содовое озеро Магади, Кения	15 – 45 (37)	7,0 – 10,0 (9,5 – 9,7)	H ₂ ^{**} , формиат ^{**}	(Zhilina et al., 1997)
<i>Desulfonatronovibrio magnus</i>	Содовое озеро Танатар-5, Россия	До 41	8,5 – 10,5 (10,0)	H ₂ ^{**} , формиат ^{**} , пируват	(Sorokin et al., 2011a)
<i>Desulfonatronovibrio thiodismutans</i>	Содовое озеро Танатар-5, Россия	До 42	8,5 – 10,5 (9,5 – 10,0)	H ₂ ^{**} , формиат ^{**} , пируват	(Sorokin et al., 2011a)
<i>Desulfonatronum alkalitolerans</i>	Биореактор Тиопак, Нидерланды	До 42	7,5 – 9,7 (8,5 – 9,0)	H ₂ ^{**} , формиат ^{**} , лактат, пируват	(Sorokin, Tourova, Muyzer, 2013)

Таблица 4. (продолжение)

<i>Desulfonatronum buryatense</i>	Озеро Соленое, Бурятия, Россия	20 – 40 (34)	7,5 – 10,5 (9,4)	Формиат ^{**} , лактат, этанол, пируват	(Ryzhmanova et al., 2013)
<i>Desulfonatronum cooperativum</i>	Содовое озеро Хадын, Россия	15 – 40 (35 – 38)	6,7 – 10,3 (8,0 – 9,0)	H ₂ ^{**} , формиат ^{**} , лактат	(Zhilina et al., 2005b)
<i>Desulfonatronum lacustre</i>	Содовое озеро Хадын, Россия	22 – 45 (30)	8,0 – 10,1 (9,3 – 9,5)	H ₂ ^{**} , формиат ^{**} , лактат, этанол	(Pikuta et al., 1998)
<i>Desulfonatronum paranguenense</i>	Щелочное кратерное озеро Гуанахуато, Мексика	15 – 40 (35)	8,3 – 10,4 (9,0)	H ₂ ^{**} , формиат ^{**} , лактат, пируват, этанол	(Pérez Bernal et al., 2017)
<i>Desulfonatronum thioautotrophicum</i>	Содовое озеро, Кулундинская равнина, Алтай, Россия	До 42	8,3 – 10,5 (9,3)	H ₂ ^{**} , формиат ^{**} , лактат, пируват, этанол	(Sorokin et al., 2011a)
<i>Desulfonatronum thiosulphatophilum</i>	Содовое озеро, Кулундинская равнина, Алтай, Россия	До 40	8,0 – 10,4 (9,5)	H ₂ ^{**} , формиат ^{**} , лактат, пируват, этанол	(Sorokin et al., 2011a)
<i>Desulfonatronum thiodismutans</i>	Содовое озеро Моно, Калифорния	15 – 48 (37)	8,0 – 10,0 (9,5)	H ₂ ^{**} , формиат ^{**} , этанол	(Pikuta et al., 2003)
<i>Desulfonatronum zhilinae</i>	Содовое озеро Альгинское, Россия	10 – 40 (36)	8,0 – 10,5 (9,0)	H ₂ ^{**} , формиат ^{**} , лактат, пируват	(Zakharyuk et al., 2015)

Таблица 4 (продолжение)

<i>Desulfovibrio psychrotolerans</i>	Соленое озеро Пангонг, Гималаи, Индия	10 – 50 (28 – 30)	6,0 – 10,0 (8,5 – 9,0)	Формиат [*] , этанол, бутанол, пируват, лактат, малат	(Sasi Jyothsna, Sasikala, Ramana, 2008)
<i>Pseudodesulfovibrio alkaliphilus</i>	Наземный грязевой вулкан, Краснодарский край, Россия	6 – 37 (24)	7,0 – 10,5 (9,5)	H ₂ ^{**} , лактат, пируват	(Frolova et al., 2021b)

*Приведены литературные данные на 1.6.2023

**В присутствии ацетата в качестве источника углерода

2.4. Алкалофильные нитратвосстанавливающие микроорганизмы

Восстановление микроорганизмами нитрата необходимо для двух целей: с помощью ассимиляционной нитратредукции, протекающей как в аэробных, так и в анаэробных условиях, микроорганизмы извлекают азот для синтеза азотсодержащих клеточных компонентов, а в случае диссимиляционной нитратредукции (или нитратного дыхания) нитрат в анаэробных условиях служит конечным акцептором электронов.

2.4.1. Филогенетическое разнообразие алкалофильных нитратвосстанавливающих бактерий

К моменту написания работы известно около 30 видов алкалофильных нитратвосстанавливающих бактерий, являющихся представителями филумов *Actinomycetota*, *Bacillota*, *Bacteroidota*, *Chrysiogenota* и *Pseudomonadota*. Стоит отметить, однако, что способность к восстановлению нитрата зачастую не проверяется исследователями, особенно при описании микроорганизмов, сбрасывающих углеродные соединения.

Филумы *Bacillota* и *Pseudomonadota*, являющиеся одними из самых многочисленных бактериальных таксонов, включают в себя большую часть известных алкалофильных нитратвосстанавливающих бактерий (Табл. 5).

Восстановление нитрата не является родоспецифичным свойством: так, не все представители родов *Alkalihalobacterium*, *Lunatimonas* и *Serpentinimonas* являются нитратредукторами, хотя и являются алкалофилами.

Род *Desulfurispirillum* к моменту написания работы представлен двумя видами. Каждый из них восстанавливает нитрат, однако лишь *D. alkaliphilum* является алкалофильным микроорганизмом, *D. indicum* же имеет оптимальный pH 7,4 (Rauschenbach, Narasingarao, Häggblom, 2011). Похожая ситуация наблюдается у родов *Gordonia*, *Melaminivora*, *Mongoliitalea*,

Paramoritella с единственным алкалофильным представителем - *G. alkaliphila*, *M. alkalimesophila*, *M. lutea* и *P. alkaliphila*, соответственно. Восстановление нитрата не характерно для всех представителей рода *Janibacter*, единственным алкалофилом в котором является *J. alkaliphilus*. Рода *Sulfurospirillum* и *Thermolongibacillus* содержат по одному нитратвосстанавливающему алкалофильному (*S. tamanensis* и *T. kozakliensis*) алкалитолерантному (*S. alkalitolerans* и *T. altinsuensis*).

Таблица 5. Таксономическое разнообразие алкалофильных нитратвосстанавливающих микроорганизмов

Филум	Семейство	Род
<i>Actinomycetota</i>	<i>Gordoniaceae</i>	<i>Gordonia</i>
	<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Janibacter</i> , <i>Marihabitans</i>
	<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Puerhibacterium</i>
<i>Bacillota</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Alkalicocobacillus</i> , <i>Alkalihalobacterium</i> , <i>Desertibacillus</i> , <i>Polygonibacillus</i> , <i>Thermolongibacillus</i>
	<i>Halobacteroidaceae</i>	<i>Fuchsiella</i>
	<i>Natranaerobiaceae</i>	<i>Natranaerobaculum</i> , <i>Natranaerobius</i> , <i>Natronovirga</i>
	<i>Natranaerofabaceae</i>	<i>Natranaerofaba</i>
<i>Bacteroidota</i>	<i>Cyclobacteriaceae</i>	<i>Indibacter</i> , <i>Lunatimonas</i> , <i>Mongoliitalea</i>
<i>Chrysiogenota</i>	<i>Chrysiogenaceae</i>	<i>Desulfurispirillum</i>
<i>Pseudomonadota</i>	<i>Campylobacteraceae</i>	<i>Sulfurospirillum</i>
	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Melaminivora</i> , <i>Serpentinimonas</i>

Таблица 5. (продолжение)

	<i>Desulfobulbaceae</i>	<i>Desulfurivibrio</i>
	<i>Ectothiorhodospiraceae</i>	<i>Alkalilimnicola</i>
	<i>Hyphomonadaceae</i>	<i>Fretibacter</i>
	<i>Moritellaceae</i>	<i>Paramoritella</i>
	<i>Natronospirillaceae</i>	<i>Natronospirillum</i>
	<i>Paracoccaceae</i>	<i>Roseinatronobacter</i>
	<i>Pleomorphomonadaceae</i>	<i>Mongoliimonas</i>

2.4.2. Физиологическое разнообразие алкалофильных нитратвосстанавливающих бактерий

Большая часть известных алкалофильных нитратвосстанавливающих бактерий является мезофилами с оптимальной температурой роста около 30 °С. При более высоких температурах растут представители родов *Fuchsiella*, *Melaminivora*, *Natranaerobaculum*, *Natranaerobius*, *Natranaerofaba*, *Natronovirga* и *Thermolongibacillus*.

Органотрофные алкалофильные нитратвосстанавливающие бактерии существенно преобладают над литотрофными и отличаются значительным разнообразием используемых субстратов: так, в качестве источника углерода и энергии такие микроорганизмы могут использовать сложные белковые соединения (пептон, дрожжевой экстракт, триптон и т.д.); углеводы – моно- и дисахариды или крахмал; органические кислоты – лактат, малат, пируват, фумарат, которые могут быть использованы как единственный субстрат роста или в качестве донора электронов.

Литотрофные алкалофильные нитратредукторы сравнительно немногочисленны (к моменту написания работы известно 4 рода, относящиеся к филумам *Pseudomonadota* и *Chrysiogenota*) и в основном восстанавливают нитрат с соединениями серы (сульфидом, элементной серой

или тиосульфатом). *Alkalilimnicola ehrlichii* и *Desulfurispirillum alkaliphilum* при росте с нитратом используют водород в присутствии органического источника углерода (ацетата). *Alkalilimnicola ehrlichii* также использует арсенит в качестве донора электронов.

Стоит отметить, однако, что исследователями не всегда проверяется способность микроорганизма расти за счет неорганических субстратов. Помимо этого, способность восстанавливать нитрат зачастую не подтверждается экспериментально, а выявляется по анализу генома или, чаще всего, с помощью фотометрических нитратных тестов (например, Merck Millipore nitrate test или API test). Микроорганизмы, которые согласно подобным тестам были способны к восстановлению нитрата, были также включены в Табл. 6, однако, несомненно, данная способность должна быть проверена экспериментально.

2.4.3. Экологическое разнообразие алкалофильных нитратвосстанавливающих бактерий

Как и в случае с алкалофильными сульфатредукторами, основным источником выделения алкалофильных нитратвосстанавливающих бактерий являются щелочные и содовые озера РФ, США, Монголии, Индии, Танзании, Египта, Кении (Табл. 6). Ряд микроорганизмов был выделен из содовых солончаковых и ризосферных почв и из почвы термального горячего источника.

Антропогенные источники выделения алкалофильных нитратвосстанавливающих бактерий разнообразны: так, *Alkalicocccobacillus murimartini* была выделена из церковной фрески, *Anaerobacillus isosaccharicus* – из печи для обжига извести, а *Desulfurispirillum alkaliphilum* – из биореактора. *Polygonibacillus indicireducens* и *Puerhibacterium puerhi* были выделены из пищевых источников – ферментированного ликера и чая пуэр, соответственно.

Таблица 6. Физиологическое разнообразие алкалофильных нитратвосстанавливающих микроорганизмов*

Микроорганизм	Источник выделения	Условия культивирования		Продукт восстановления нитрата	Ссылка
		Т (опт)	рН (опт)		
<i>Alkalicoccobacillus murimartini</i>	Церковная фреска, Германия	10 – 30 (15 – 20)	7,0 – 10,0 (8,5)	NO ₂ ⁻	(Borchert et al., 2007)
<i>Alkalihalobacterium alkalinitrilicus</i>	Содовые солончаковые почвы	15 – 41 (32)	7,0 – 10,2 (9,0)	NO ₂ ⁻	(Sorokin, Pelt van, Tourova, 2008)
<i>Alkalihalobacterium elongatum</i>	Щелочное озеро Лонар, Индия	10 – 45 (37)	8,0 – 11,0 (10,0)	NO ₂ ⁻	(Joshi et al., 2021)
<i>Alkalilimnicola halodurans</i>	Содовое озеро Натрон, Танзания	20 – 55 (35)	Н.д. (> 8,5)	NO ₂ ⁻	(Yakimov et al., 2001)
<i>Alkalilimnicola ehrlichii</i>	Щелочное гиперсоленое озеро Моно, США	13 – 40 (30)	7,3 – 10,0 (9,3)	NO ₂ ⁻	(Hoefl et al., 2007)
<i>Anaerobacillus alkaliphilus</i>	Ризосферная почва, Венгрия	10 – 40 (25 – 28)	7,0 – 11,0 (9,0 – 10,0)	NO ₂ ⁻	(Borsodi et al., 2019)

Таблица 6. (продолжение)

<i>Anaerobacillus isosaccharicus</i>	Печь для обжига извести, Бакстон, Великобритания	10 – 40 (30)	8,5 – 11,0 (9,8 – 10,0)	NO_2^-	(Bassil, Lloyd, 2019)
<i>Anaerobacillus selenitireducens</i>	Содовое озеро, США	Н.д.	Н.д. (8,5 – 10,0)	NO_2^-	(Switzer Blum et al., 1998)
<i>Anoxybacillus pushchinoensis</i>	Корово-свиной навоз, Россия	37 – 66 (62)	8,0 – 10,5 (9,5 – 9,7)	NO_2^-	(Pikuta et al., 2000b)
<i>Desertibacillus haloalkaliphilus</i>	Соляная пустыня, Индия	20 – 55 (37)	7,0 – 10,5 (9,0)	Н.д.	(Bhatt et al., 2017)
<i>Desulfurispirillum alkaliphilum</i>	Биореактор Тиопак, Нидерланды	До 45 (35)	8,0 – 10,2 (9,0)	NH_4^+	(Sorokin et al., 2007)
<i>Desulfurivibrio alkaliphilus</i>	Галощелочное озеро, Египет	До 42	8,5 – 10,3 (9,5)	NH_4^+	(Sorokin et al., 2008a)
<i>Fuchsiella alkaliacetigena</i>	Содовое озеро Танатар III, РФ	25 – 45 (40)	8,5 – 10,5 (8,8-9,3)	NH_4^+	(Zhilina et al., 2012)
<i>Fuchsiella ferrireducens</i>	Содовое озеро Танатар III, РФ	25 – 45 (30 – 37)	8,5 – 10,2 (9,8)	NH_4^+	(Zhilina et al., 2015)

Таблица 6. (продолжение)

<i>Gordonia alkaliphila</i>	Морские отложения, Южная Корея	20 – 30 (28)	6,0 – 11,0 (9,0)	NO ₂ ⁻	(Cha, Cha, 2013)
<i>Indibacter alkaliphilus</i>	Щелочное озеро Лонар, Индия	15 – 40 (30 – 37)	7,5 – 12,0 (10,0)	NO ₂ ⁻	(Anil Kumar et al., 2010a)
<i>Janibacter alkaliphilus</i>	Горгоранский коралл <i>Anthogorgia</i> sp.	20 – 40 (25 – 30)	7,0 – 11,0 (9,0 – 10,0)	Н.д.	(Li et al., 2012)
<i>Lunatimonas lonarensis</i>	Щелочное озеро Лонар, Индия	25 – 35 (30)	7,0 – 12,0 (9,0)	NO ₂ ⁻	(Srinivas et al., 2014)
<i>Marihabitans asiaticum</i>	Морская вода в порту, Япония	18 – 34 (Н.д.)	Н.д. (9,0)	Н.д.	(Kageyama et al., 2008)
<i>Melaminivora alkalimesophila</i>	Сточные воды меламинового завода, Япония	15 – 50 (40 – 45)	7,0 – 9,5 (9,5)	NO ₂ ⁻	(Wang et al., 2014)
<i>Mongoliitalea lutea</i>	Щелочно-соленое озеро, Монголия	0 – 40 (33)	6,5 – 12,0 (9,0)	NO ₂ ⁻	(Yang et al., 2012a)
<i>Natranaerobaculum magadiense</i>	Содовое озеро, Кения	20 – 57 (45 – 50)	7,5 – 10,7 (9,25 – 9,5)	NH ₄ ⁺	(Zavarzina et al., 2013)

Таблица 6. (продолжение)

<i>Natranaerobius thermophilus</i>	Содовое озеро, Египет	35 – 56 (53)	8,3 – 9,6 (10,5)	NH_4^+	(Mesbah et al., 2007)
<i>Natranaerobius trueperi</i>	Содовое озеро, Египет	26 – 55 (52)	8,0 – 10,8 (9,5)	NH_4^+	(Mesbah, Wiegel, 2009)
<i>Natranaerofaba carboxydovora</i>	Содовое озеро, РФ	35 – 56 (48 – 50)	9,0 – 10,5 (9,5 – 9,7)	NH_4^+	(Sorokin et al., 2021)
<i>Natronospirillum operosum</i>	Разлагающаяся биомасса лабораторной культуры цианобактерий рода <i>Geitlerinema</i>	4 – 45 (31 – 37)	7,3 – 9,4 (8,7 – 8,9)	NO_2^-	(Kevbrin et al., 2020)
<i>Natronovirga wadinatrunensis</i>	Содовое озеро, Египет	26 – 56 (51)	8,5 – 11,5 (9,9)	NH_4^+	(Mesbah, Wiegel, 2009)
<i>Paramoritella alkaliphila</i>	Кораллы и морские пески, Палау, Океания	15 – 37 (30)	7,0 – 11,0 (9,0)	NO_2^-	(Hosoya et al., 2009)
<i>Polygonibacillus indicireducens</i>	Ферментированный образец ликера, Япония	13 – 45 (35 – 37)	8,0 – 12,0 (10,0)	Н.д.	(Hirota et al., 2016)
<i>Puerhibacterium puerhi</i>	Чай пуэр, Китай	15 – 37 30	6,0 – 11,0 (9,0)	NO_2^-	(Yang et al., 2021)
<i>Roseinatronobacter monicus</i>	Щелочное гиперсоленое озеро Моно, США	Н.д.	8,0 – 10,0	NO_2^-	(Болдарева и др., 2007)

Таблица 6. (продолжение)

		(25 – 30)	(9,0 – 9,5)		
<i>Roseinatronobacter thiooxidans</i>	Содовое озеро, РФ	Н.д.	8,5 – 10,4 (10,0)	NO_2^-	(Сорокин и др., 2000)
<i>Serpentinimonas barnesii</i>	Щелочной ручей, США	18 – 37 (30)	9,0 – 12,0 (11,0)	Н.д.	(Bird et al., 2021)
<i>Serpentinimonas maccroryi</i>	Щелочной ручей, США	18 – 37 (30)	9,0 – 12,5 (11,0)	Н.д.	(Bird et al., 2021)
<i>Sulfurospirillum alkalitolerans</i>	Биореактор, Нидерланды	До 41 (н.д.)	7,1 – 9,7 (8,5)	NH_4^+	(Sorokin, Tourova, Muyzer, 2013)
<i>Sulfurospirillum tamanensis</i>	Грязевой вулкан, РФ	6 – 42 (30)	8,0 – 11,0 (9,0)	NH_4^+	(Фролова и др., 2023а)
<i>Thermolongibacillus kozakliensis</i>	Почва термального горячего источника	40 – 70 (60)	5,0 – 11,0 (9,0)	NO_2^-	(Cihan et al., 2014)

*Приведены литературные данные на 1.6.2023.

Н.д. – нет литературных данных (продукт восстановления нитрата не определялся авторами исследований)

2.5. Алкалофильные микроорганизмы, сбраживающие соединения углерода

Брожение – это биохимический процесс, заключающийся в окислительно-восстановительных превращениях органических соединений за счет субстратного фосфорилирования.

В качестве субстрата в процессах брожения выступают различные органические соединения, в которых углерод окислен не полностью: углеводы, спирты, органические кислоты, аминокислоты, гетероциклические соединения.

2.5.1. Филогенетическое разнообразие микроорганизмов, сбраживающих углеродные соединения

Микроорганизмы, сбраживающие различные соединения углерода, являются самой большой группой среди алкалофилов. К моменту написания работы описано свыше 50-ти родов алкалофильных бродильщиков, относящиеся к филумам *Actinomycetota*, *Bacillota*, *Bacteroidota*, *Chrysiogenota*, *Fibrobacterota*, *Planctomycetota*, *Pseudomonadota*, *Rhodothermota* и *Spirochaetota*.

Филум *Bacillota* включает в себя самое большое количество описанных алкалофильных микроорганизмов, сбраживающих соединения углерода, которые относятся к семействам *Bacillaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Eubacteraceae*, *Halobacteroidaceae*, *Lachnospiraceae*, *Natronaerobiaceae*, *Oscillospiraceae*, *Paenibacillaceae*, *Peptococcaceae*, *Proteinivoraceae*, *Syntrophomonadaceae* и *Vallitaleaceae*. Также большое количество алкалофильных бродильщиков характерно для филумов *Pseudomonadota* и *Actinomycetota*. Внутри филумов *Chrysiogenota*, и *Spirochaetota* же, напротив, известно всего по одному роду алкалофильных бродильщиков.

Способность к оптимальному росту в алкалофильных условиях не является определяющей характеристикой – зачастую внутри одного рода

встречаются как алкалофильные, так и нейтрофильные микроорганизмы, в отличие от способности сбразивать различные соединения углерода, характерной для всех представителей таксона уровня рода (Табл. 7).

Таблица 7. Таксономическое разнообразие алкалофильных микроорганизмов, сбразивающих соединения углерода

Филум	Семейство	Род
<i>Actinomycetota</i>	<i>Bogoriellaceae</i>	<i>Bogoriella</i>
	<i>Egibacteraceae</i>	<i>Egibacter</i>
	<i>Gordoniaceae</i>	<i>Gordonia</i>
	<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Marihabitans</i>
	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Nesterenkonia</i>
	<i>Nocardiopsidaceae</i>	<i>Lipingzhangella</i>
	<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Puerhibacterium</i>
<i>Bacillota</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Alkalihalophilus, Alkalilactibacillus, Anaerobacillus, Anoxybacillus, Desertibacillus, Fermentibacillus, Gracillibacillus, Halalkalibacterium, Halobacillus, Litchfieldia, Natronobacillus, Paralkalibacillus, Salicibacter, Salipaludibacillus, Thermolongibacillus</i>
	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Alkalibacterium</i>
	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Alkaliphilus, Anoxynatronum, Clostridium, Isachenkonion, Natronincola, Serpentinicella</i>
	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Alkalibacter</i>

Таблица 7. (продолжение)

	<i>Halobacteroidaceae</i>	<i>Natroniella</i>
	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Anaerotalea, Natranaerovirga</i>
	<i>Natranaerobiaceae</i>	<i>Natranaeobaculum, Natranaerobius, Natronovirga</i>
	<i>Oscillospiraceae</i>	<i>Cellulosibacter</i>
	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Xylanibacillus</i>
	<i>Peptococcaceae</i>	<i>Desulfitispora</i>
	<i>Proteinivoraceae</i>	<i>Alkalicella</i>
	<i>Syntrophomonadaceae</i>	<i>Dethiobacter</i>
	<i>Vallitaleaceae</i>	<i>Petrocella</i>
	<i>Cyclobacteriaceae</i>	<i>Indibacter, Lunatimonas, Mongoliitalea, Nitritalea, Rhodonellum</i>
<i>Bacteroidota</i>	<i>Marinilabiliaceae</i>	<i>Alkalitalea, Natronoflexus</i>
	<i>Chrysiogenaceae</i>	<i>Desulfurispirillum</i>
<i>Chrysiogenota</i>	<i>Chitinispirillaceae</i>	<i>Chitinispirillum</i>
<i>Fibrobacterota</i>	<i>Chitinivibrionaceae</i>	<i>Chitinivibrio</i>
<i>Pseudomonadota</i>	<i>Campylobacteraceae</i>	<i>Sulfurospirillum</i>
	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Serpentinimonas</i>
	<i>Desulfobulbaceae</i>	<i>Desulfobotulus</i>
	<i>Desulfonatronaceae</i>	<i>Desulfonatronum</i>
	<i>Desulfovibrionaceae</i>	<i>Desulfohalovibrio, Desulfovibrio, Pseudodesulfovibrio</i>
	<i>Lysobacteraceae</i>	<i>Silanimonas</i>
	<i>Moritellaceae</i>	<i>Paramoritella</i>
	<i>Paracoccaceae</i>	<i>Roseinatronobacter</i>
	<i>Roseobacteraceae</i>	<i>Maritimibacter</i>

Таблица 7. (продолжение)

	<i>Stappiaceae</i>	<i>Pannonibacter</i>
	-	<i>Arsukibacterium</i>
<i>Spirochaetota</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Alkalispirochaeta</i>

2.5.2. Физиологическое разнообразие микроорганизмов, сбраживающих углеродные соединения

Большинство алкалофильных брожилыщиков являются мезофиллами с оптимальной температурой роста 25 – 35 °С (Табл. 8). Среди представителей родов *Anoxybacillus*, *Cellulosibacter*, *Natronaerobaculum*, *Natronaerobius*, *Natronovirga* и *Thermolongibacillus* известны умеренно термофильные и термофильные представителями с оптимальной температурой роста 55 °С или выше. *Rhodonellum psychrophilum*, выделенный из икаитовых колонн Гренландии, является единственным известным к настоящему времени психрофильным бродильщиком с оптимальной температурой роста 5 °С.

Разнообразие субстратов, используемых алкалофильными бродильщиками, весьма велико: углеводы, спирты, органические кислоты, аминокислоты, пурины, пиримидины и углеводороды. Продуктами брожения являются различные органические кислоты (молочная, уксусная, масляная и т.д.), спирты (этиловый, пропиловый и т.д.), ацетон, газы (H₂, CO₂). Стоит отметить, что продукты брожения не всегда определяются исследователями с помощью методов газо-жидкостной хроматографии. Зачастую о способности микроорганизмов к росту за счет сбраживания углеродных соединений утверждается на основе тест-систем, например, API 50CH (bioMérieux), показывающих образование органической кислоты при росте на потенциально сбраживаемых субстратах. Подобные алкалофильные микроорганизмы были включены в Табл. 8, однако для более точных данных

продукты реакции должны быть проверены с помощью хроматографических методов.

2.5.3 Экологическое разнообразие микроорганизмов, сбраживающих углеродные соединения

Большинство алкалофильных бродильщиков было выделено из природных местообитаний с высоким уровнем щелочности и/или солености: щелочных и содовых озер, расположенных по всему континенту, щелочных источников, щелочных почв, соляных пустынь (Табл. 8). Психрофильный алкалофильный бродильщик был выделен из колонны икаита.

Некоторые алкалофильные бродильщики были выделены из морских местообитаний с нейтральным рН, например, из глубоководных осадков, морского песка, морских отложений, морской воды в порту.

Антропогенные местообитания алкалофильных бродильщиков также разнообразны: микроорганизмы были выделены из промывочной воды на производстве оливок, реактора теплоцентрали, биореактора, компоста. Пищевые источники выделения алкалофильных бродильщиков представлены чаем пуэром и национальным блюдом корейской кухни, квашеными овощами кимчхи.

В ходе выполнения данной работы впервые был выделен алкалофильный бродильщик из наземного грязевого вулкана.

Таблица 8. Физиологическое разнообразие алкалофильных микроорганизмов, сбраживающих углеродные соединения

Микроорганизм*	Источник выделения	Условия культивирования		Продукт** (субстрат***)	Ссылка
		Т (опт)	рН (опт)		
<i>Alkalibacter saccharofermentans</i>	Содовое озеро, РФ	6 – 50 (35)	7,2 – 10,2 (9,0)	Ацетат, этанол, формиат, H ₂ , CO ₂	(Garnova et al., 2004)
<i>Alkalibacterium olivoapovliticus</i>	Промывочная вода на производстве оливок	Н.д. (27 – 32)	Н.д. (9,0 – 9,4)	Лактат	(Ntougias, Russell, 2001)
<i>Alkalicella calidoniensis</i>	Щелочной термальный источник, Новая Зеландия	25 – 50 (37)	8,2 – 10,8 (9,5)	Ацетат, формиат (пируват)	(Quéméneur et al., 2021)
<i>Alkalihalophilus lindianensis</i>	Алиновая щелочная почва, Китай	10 – 45 (37)	8,0 – 12,0 (9,0)	Н.д.	(Dou et al., 2016)
<i>Alkalilactibacillus ikkensis</i>	Икаитовые колонны, Гренландия	0 – 25 (20)	9,0 – 10,7 (Н.д.)	Н.д.	(Schmidt et al., 2012)
<i>Alkaliphilus peptidofermentans</i>	Содовое озеро, РФ	6 – 40 (35)	7,5 – 9,7 (9,1)	Ацетат, формиат (ДЭ)	(Zhilina et al., 2009)

Таблица 8. (продолжение)

<i>Alkalispirochaeta alkalica</i>	Цианобактериальный мат щелочного озера, Кения	15 – 44 (33 – 37)	Н.д. (8,7 – 9,6)	Ацетат, H ₂ , CO ₂	(Zhilina et al., 1996)
<i>Alkalitalea saponilacus</i>	Щелочное озеро, США	8 – 40 (35 – 37)	7,5 – 10,5 (9,7)	Пропионат, ацетат (ксилан)	(Zhao, Chen, 2012)
<i>Anaerobacillus alkalilacustre</i>	Содовое озеро, РФ	18 – 40 (30 – 35)	8,5 – 10,7 (9,6 – 9,7)	Этанол, формиат, ацетат, лактат	(Zavarzina et al., 2009)
<i>Anaerotalea alkaliphila</i>	Грязевой вулкан, РФ	14 – 42 (37)	7,5 – 11,0 (9,0)	Этанол, CO ₂ , H ₂	(Frolova et al., 2021a)
<i>Anoxybacillus pushchinoensis</i>	Корово-свиной навоз, РФ	37 – 66 (62)	8,0 – 10,5 (9,5 – 9,7)	Ацетат, H ₂	(Pikuta et al., 2000b)
<i>Anoxynatronum sibiricum</i>	Цианобактериальный мат, РФ	25 – 41 (35)	7,1 – 10,1 (9,1)	Ацетат, этанол	(Garnova et al., 2003)
<i>Arsukibacterium ikkense</i>	Икаитовые колонны, Гренландия	0 – 30 (15)	7,5 – 10,0 (9,2 – 10,0)	Н.д.	(Schmidt, Priemé, Stougaard, 2007)
<i>Bogoriella caseilytica</i>	Содовое озеро, Кения	Н.д.	Н.д.	Н.д.	(Groth et al., 1997)

Таблица 8. (продолжение)

		(28 – 37)	(9,0 – 10,0)		
<i>Cellulosibacter alkalithermophilus</i>	Кокосовый сад, Тайланд	50 – 65 (55)	8,0 – 10,0 (9,5)	Ацетат, этанол, пропионат, бутират (целлобиоза)	(Watthanalamlot et al., 2012)
<i>Chitinispirillum alkalipilum</i>	Гиперсоленое озеро, Египет	Н.д. – 43 (33 – 35)	8,5 – 10,5 (9,5 – 10,0)	Н ₂ , ацетат, глицерол, этанол, формиат (хитин)	(Sorokin et al., 2016)
<i>Chitinivibrio alkaliphilus</i>	Гиперсоленое озеро, Египет	До 45	8,5 – 10,6 (9,5 – 10,0)	Н ₂ , формиат, ацетат, этанол, лактат, глицерол (хитин)	(Sorokin et al., 2014)
<i>Clostridium alkalicellulosi</i>	Содовое озеро, РФ	Н.д.	8,0 – 10,2 (9,0)	Лактат, этанол, ацетат, Н ₂ , формиат (целлюлоза, целлобиоза)	(Жилина и др., 2005а)
<i>Desertibacillus haloalkaliphilus</i>	Соляная пустыня, Индия	20 – 55 (37)	7,0 – 10,5 (9,0)	Н.д.	(Bhatt et al., 2017)

Таблица 8. (продолжение)

<i>Desulfitispora alkaliphila</i>	Содовое озеро, РФ	До 43	8,5 – 10,3 (9,5)	Н.д.	(Sorokin, Muyzer, 2010)
<i>Desulfobotulus alkaliphilus</i>	Содовое озеро, Кулундинская равнина, Алтай, Россия	До 40 (32)	8,7 – 10,7 (10,0 – 10,5)	Ацетат (пируват)	(Sorokin, Detkova, Muyzer, 2010)
<i>Desulfohalovibrio alkalitolerans</i>	Реактор теплоцентрали, Дания	16 – 47 43	6,9 – 9,9 (9,0 – 9,4)	Ацетат, CO ₂ , H ₂ (пируват)	(Abildgaard et al., 2006)
<i>Desulfonatronum alkalitolerans</i>	Биореактор Тиопак, Нидерланды	До 42	7,5 – 9,7 (8,5 – 9,0)	Н.д.	(Sorokin, Tourova, Muyzer, 2013)
<i>Desulfurispirillum alkaliphilum</i>	Биореактор Тиопак, Нидерланды	До 45 (35)	8,0 – 10,2 (9,0)	Н.д.	(Sorokin et al., 2007)
<i>Desulfurivibrio alkaliphilus</i>	Галощелочное озеро, Египет	До 42	8,5 – 10,3 (9,5)	Н.д.	(Sorokin et al., 2008a)
<i>Dethiobacter alkaliphilus</i>	Содовое озеро, Монголия	До 45	8,5 – 10,3 (9,5)	Н.д.	(Sorokin et al., 2008a)
<i>Egibacter rhizosphaerae</i>	Ризосферная почва, Китай	25 – 50	7,0 – 11,0	Н.д.	(Zhang et al., 2016a)

Таблица 8. (продолжение)

		(30 – 35)	(9,0 – 10,0)		
<i>Fermentibacillus polygoni</i>	Ферментированная жидкость <i>Polygonum indigo</i>	12 – 40 (30 – 33)	7,5 – 12 (9,0 – 10,0)	Н.д.	(Hirota, Aino, Yumoto, 2016)
<i>Gordonia alkaliphila</i>	Морские отложения, Южная Корея	20 – 30 (28)	6,0 – 11,0 (9,0)	Н.д.	(Cha, Cha, 2013)
<i>Gracillibacillus alkaliphilus</i>	Ферментированная жидкость <i>Polygonum indigo</i>	13 – 48 (39)	7,0 – 10,0 (9,0)	Лактат	(Hirota et al., 2014)
<i>Halalkalibacterium ligniniphilus</i>	Морские осадочные породы, Китай	10 – 45 (30)	6,0 – 11,0 (9,0)	Н.д.	(Zhu et al., 2014)
<i>Halobacillus alkaliphilus</i>	Соленое озеро, Испания	25 – 45 (37)	6,0 – 10,0 (9,0)	Н.д.	(Romano et al., 2008)
<i>Indibacter alkaliphilus</i>	Щелочное озеро Лонар, Индия	15 – 40 (30 – 37)	7,5 – 12,0 (10,0)	Н.д.	(Anil Kumar et al., 2010a)

Таблица 8. (продолжение)

<i>Isachenkonina alkalipeptolitica</i>	Содовое озеро, РФ	10 – 43 (37)	7,5 – 10,2 (9,0 – 9,3)	Формиат, ацетат, аммоний (триптон)	(Zavarzina et al., 2020)
<i>Lipingzhangella halophila</i>	Почвы пустыни, Китай	15 – 40 (30)	7,0 – 11,0 (9,0 – 10,0)	Н.д.	(Zhang et al., 2016b)
<i>Lunatimonas lonarensis</i>	Щелочное озеро Лонар, Индия	25 – 35 (30)	7,0 – 12,0 (9,0)	Н.д.	(Srinivas et al., 2014)
<i>Marihabitans asiaticum</i>	Морская вода в порту, Япония	18 – 34 (Н.д.)	Н.д. (9,0)	Н.д.	(Kageyama et al., 2008)
<i>Maritimibacter alkaliphilus</i>	Атлантический океан	16 – 37 (30)	4,0 – 12,0 (10,0)	Н.д.	(Lee et al., 2007)
<i>Mongoliitalea lutea</i>	Щелочно-соленое озеро, Монголия	0 – 40 (33)	6,5 – 12,0 (9,0)	Н.д.	(Yang et al., 2012a)
<i>Natranaerobaculum magadiense</i>	Содовое озеро, Кения	20 – 57 (45 – 50)	7,5 – 10,7 (9,25 – 9,5)	Ацетат, сукцинат, формиат, лактат, попионат, изовалерат	(Zavarzina et al., 2013)

Таблица 8. (продолжение)

				(дрожжевой экстракт)	
<i>Natronaerobius thermophilus</i>	Содовое озеро, Египет	35 – 56 (53)	8,3 – 9,6 (10,5)	Ацетат, формиат, лактат (сахароза)	(Mesbah et al., 2007)
<i>Natronaerovirga pectinivora</i>	Солончаковые почвы, РФ	До 42	8,0 – 10,5 (9,7 – 10,0)	Ацетат, формиат (галактурановая кислота)	(Sorokin et al., 2012a)
<i>Natroniella acetiana</i>	Содовое озеро, Кения	До 42 (37)	8,1 – 10,7 (9,7)	Ацетат	(Zhilina et al., 1996)
<i>Natronoincola histidivorans</i>	Содовое озеро, Кения	До 45 (37)	8,0 – 10,5 (9,4)	Ацетат, аммоний (глутамат)	(Zhilina et al., 1998)
<i>Natronobacillus azotifigens</i>	Содовое озеро, Египет	Н.д. (36 – 38)	7,5 – 10,6 (9,5 – 10,0)	Ацетат, этанол, формиат	(Sorokin et al., 2008b)
<i>Natronoflexus pectinivorans</i>	Содовое озеро, РФ	До 41 (30)	8,0 – 10,5 (9,5)	Ацетат, сукцинат (галактурановая	(Sorokin et al., 2011b)

Таблица 8. (продолжение)

				кислота)	
<i>Natronovirga wadinatrunensis</i>	Содовое озеро, Египет	26 – 56 (51)	8,5 – 11,5 (9,9)	Лактат, ацетат (пируват)	(Mesbah, Wiegel, 2009)
<i>Nesterenkonia alkaliphila</i>	Глубоководные отложения, Тихий океан	4 – 50 (40)	7,0 – 12,0 (9,0)	Н.д.	(Zhang et al., 2015)
<i>Nitritalea halalkaliphila</i>	Щелочное озеро Лонар, Индия	25 – 40 (37)	7,5 – 12,0 (10,0)	Н.д.	(Anil Kumar et al., 2010b)
<i>Pannonibacter phragmitetus</i>	Корневища тростника, Венгрия	10 - 37 (22 – 28)	7,0 – 11,0 (9,0 – 10,0)	Н.д.	(Borsodi et al., 2003)
<i>Paralkalibacillus indicireducens</i>	Ферментированная жидкость <i>Polygonum indigo</i>	18 – 40 (33)	8,0 – 11,0 (9,0 – 10,0)	Н.д.	(Hirota et al., 2017)
<i>Paramoritella alkaliphila</i>	Кораллы и морские пески, Палау, Океания	15 – 37 (30)	7,0 – 11,0 (9,0)	Н.д.	(Hosoya et al., 2009)
<i>Pseudodesulfovibrio alkaliphilus</i>	Наземный грязевой вулкан, Краснодарский край, Россия	6 – 37	7,0 – 10,5	Ацетат	(Frolova et al., 2021b)

Таблица 8. (продолжение)

		(24)	(9,5)	(лактат)	
<i>Puerhibacterium puerhi</i>	Чай пуэр, Китай	15 – 37 30	6,0 – 11,0 (9,0)	Н.д.	(Yang et al., 2021)
<i>Rhodonellum psychrophilum</i>	Икаитовые колонны, Гренландия	0 – 22 (5)	7,5 – 10,7 (9,2 – 10,0)	Н.д.	(Schmidt, Priemé, Stougaard, 2006a)
<i>Roseinatronobacter thiooxidans</i>	Содовое озеро, РФ	Н.д.	8,5 – 10,4 (10,0)	Н.д.	(Сорокин и др., 2000)
<i>Salicibibacter kimchii</i>	Кимчхи, Корея	20 – 40 (37)	6,5 – 10,0 (9,0)	Н.д.	(Jang et al., 2018)
<i>Salipaludibacillus aurantiacus</i>	Содовое озеро, Индия	20 – 45 (37)	8,0 – 11,0 (9,0)	Н.д.	(Sultanpuram, Mothe, 2016)
<i>Serpentinicella alkaliphila</i>	Гиперщелочной источник, Новая Каледония	30 – 43 (37)	7,8 – 10,1 (9,5)	Ацетат, пропионат (лактат)	(Mei et al., 2016)
<i>Silanimonas lenta</i>	Горячий источник, Индия	25 – 53 (47)	6,0 – 10,0 (9,0)	Н.д.	(Lee et al., 2005)

Таблица 8. (продолжение)

<i>Sulfurospirillum tamanensis</i>	Грязевой вулкан, РФ	6 – 42 (30)	8,0 – 11,0 (9,0)	Сукцинат, ацетат (малат, фумарат)	(Фролова и др., 2023а)
<i>Thermolongibacillus kozakliensis</i>	Почва термального горячего источника	40 – 70 (60)	5,0 – 11,0 (9,0)	Н.д.	(Cihan et al., 2014)
<i>Xylanibacillus composti</i>	Компост, Венгрия	30 – 50 (35 – 40)	7,0 – 10,0 (10,0)	Н.д.	(Kukolya et al., 2018)

*Указан только типовой представитель рода, если он является алкалофилом, либо один из не типовых алкалофильных представителей рода

** Н.д. – нет данных (способность к сбраживанию субстратов проверялась с помощью различных тестов и в литературных источниках указано только, что результаты этого теста были положительными, но нет продуктов реакции)

***По умолчанию указаны продукты сбраживания глюкозы, если таковые данные есть в литературном источнике. Если указаны продукты брожения другого субстрата, он указывается в скобках.

2.6. Значение алкалофильных микроорганизмов

С каждым годом растет число публикаций, посвященных исследованию разнообразия и метаболизма алкалофильных микроорганизмов, что убедительно доказывает их важность, как для фундаментальных, так и для прикладных исследований в микробиологии и биотехнологии. Наряду с термофильными микроорганизмами, алкалофилы, возможно, являются древнейшими организмами на Земле, соответственно, их изучение расширяет представления о том периоде истории нашей планеты, когда биосфера была исключительно прокариотической.

Алкалофильные микроорганизмы обладают необходимыми для выживания в щелочной среде ферментами, в связи, с чем они могут представлять определенный интерес для биотехнологического применения, особенно в неблагоприятных условиях, а также находят свое применение в пищевой, косметической, фармацевтической и медицинской отраслях. Так, синтезируемые алкалофильными микроорганизмами экзополисахариды используются в качестве загустителей и эмульгаторов в пищевой и медицинской отраслях, а также в процессах газо- и нефтедобычи. Протеазы могут использоваться в качестве компонентов моющих средств, растворов для контактных линз, в производстве сыра и переработке мясных продуктов (Gupta, Beg, Lorenz, 2002). Щелочные амилазы сохраняют в активность в pH выше 8.0 и применяются в производстве моющих средств (Sarethy et al., 2011). Соле- и щелочеустойчивые целлюлазы, полученных из алкалофильных микроорганизмов, помимо применения в текстильной и пищевой промышленности также являются компонентами моющих средств (Ito, 1997).

Галокалкалофильные микроорганизмы представители родов *Tetragenococcus*, *Halobacillus*, *Lentibacillus* и *Halomonas* играют важную роль в процессах ферментации и используются при приготовлении некоторых традиционно ферментированных национальных блюд (Oren, 2011).

Развитие геномных, метагеномных и протеомных подходов расширило представление исследователей об алкалофильных микроорганизмах, следовательно, в течение ближайших нескольких лет вероятны новые фундаментальные открытия в этой области и идеи применения этих микроорганизмов в различных аспектах жизнедеятельности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 3. Материалы и методы исследования

3.1. Объекты исследования

Объектами исследования выступали чистые и накопительные культуры анаэробных алкалофильных микроорганизмов, выделенные из наземных грязевых вулканов (НГВ) в ходе выполнения данной работы. Образцы грязевулканических флюидов (грязь, брекчии, жидкая фаза) из НГВ были отобраны в ходе экспедиции лаборатории разнообразия и экологии экстремофильных микроорганизмов на полуостров Тамань (Краснодарский край, РФ) в мае 2017 г. Микроорганизмы, рассматриваемые в данной работе, были выделены из грязевых котлов и грифонов, расположенных на площадке грязевого вулкана Гнилая Гора (Темрюкский район, Краснодарский край, РФ). GPS координаты – 45.251° N, 37.436° E

Основные характеристики и фотографии места отбора проб, использованных в работе, представлены в Таблице 9 и на Рисунке 2.

Таблица 9. Характеристики природных образцов, использованных для получения накопительных культур анаэробных алкалофильных микроорганизмов

Обозначение	Место отбора	Описание пробы	T, °C	pH	Cl ⁻ , mM	SO ₄ ²⁻ , mM
M01	Грязевой котел. Диаметр 0,7-1,1 м	Серая грязь	20	8,5	15,69	5,31
M03	Грязевой котел. Диаметр 1,3-1,5 м	Желтоватая грязь	20	8,5	18,28	1,59
M04	Грифон. Высота 1,2 м, диаметр 0,5 м	Серая грязь	20	8,5	Нет данных	Нет данных
M05	Грифон. Высота 2,5 м, диаметр 5 м	Серая грязь	20	8,5	Нет данных	Нет данных

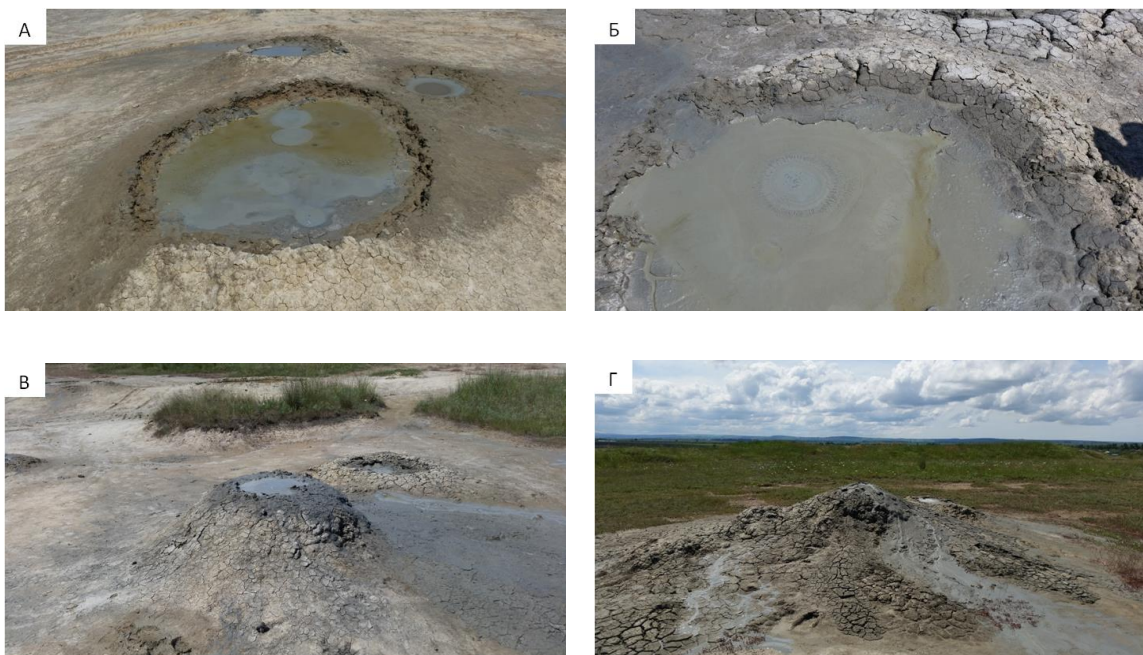


Рисунок 2. Фотографии места отбора проб (сделаны сотрудниками лаборатории разнообразия и экологии экстремофильных микроорганизмов). А – М01, Б – М03, В – М04, Г – М05.

3.2. Методы исследования

3.2.1. Отбор проб

Пробы из наземных грязевых вулканов отбирали в пластиковые пробирки (Falcon) объемом 50 мл с завинчивающейся пластиковой пробкой, которые заполняли пробой до самого верха, герметично закрывали и транспортировали в лабораторию без температурного контроля. Во время отбора проб измеряли температуру, рН воды и осадков источника, а также концентрации хлоридов и сульфатов.

3.2.2. Состав сред и условия культивирования

Для получения и культивирования накопительных и чистых культур анаэробных алкалофильных микроорганизмов использовали модифицированная среда Пфеннига (Pfennig et al., 1965).

В солончатой среде BN содержалось (г/л):

KH_2PO_4	0,33
NH_4Cl	0,33
KCl	0,33
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,33
NaCl	10,00
NaHCO_3	2,00

Во все среды добавляли 1 мл/л раствора микроэлементов и 1 мл/л раствора витаминов.

Раствор микроэлементов по (Slobodkin et al., 2012) (1 мл на 1 литр дистиллированной воды):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,0
Na_2SO_4	2,0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1,0
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1,0
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5
Na_2SeO_3	0,5
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,1
H_3BO_3	0,1
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,01

Раствор витаминов по Волину (Wolin, Wolin, Wolfe, 1963), мг/л:

биотин	20
фолиевая кислота	20

пиридоксин гидрохлорид	100
рибофлавин	50
тиамин	50
никотиновая кислота	50
пантотеновая кислота	50
B ₁₂	1
p-аминобензойная кислота	50
тиоктовая кислота	50

Все среды готовили анаэробно с применением модифицированной техники Хангейта (Жилина и Заварзин, 1978) под CO₂ или N₂ (100 %) в газовой фазе. При необходимости pH сред доводили до нужного значения при комнатной температуре путём добавления 10 % (вес/об) NaOH. В случае работы со средой, предварительно восстановленной Na₂S*9H₂O, в неё добавляли индикатор окислительно-восстановительного потенциала – резазурин, в конечной концентрации 1 мг/л.

Методика приготовления анаэробной жидкой среды. Приготовленную базовую среду кипятили в течение 10 минут и охлаждали на водяной бане под непрерывным током CO₂ (или N₂, соответственно). После охлаждения в среду добавляли витамины и NaHCO₃, затем подводили pH до необходимого значения, используя 6N растворы NaOH и HCl. Элементную серу добавляли непосредственно в пробирки. Под током CO₂ (или N₂, соответственно) среду переливали в дозатор. Далее полученную среду разливали по пробиркам также под током CO₂ (или N₂, соответственно).

Для культивирования использовали пробирки Хангейта объёмом 17 мл, заполняемые средой на 10 мл. При необходимости получения биомассы культивирование производили в 2-х литровых стеклянных бутылках, содержащих 1 л среды.

Стерилизация сред осуществлялась автоклавированием при 1 атм (в случае присутствия в пробирке Хангейта элементарной серы – при 0,5 атм) в течение 1 часа. Пересевы осуществляли анаэробно стерильными одноразовыми шприцами.

Доноры и акцепторы электронов. Для культивирования накопительных и чистых культур, а также для проверки использования различных субстратов роста были использованы следующие органические вещества: дрожжевой экстракт, пептон (оба 1 г/л), глюкоза, фруктоза, мальтоза, сахароза, лактоза, галактоза, арабиноза (5 мМ каждой), ацетат, лактат, пируват, малат, пропионат, бутират, фумарат, сукцинат, цитрат, формиат (10 мМ каждого), метанол, этанол, пропанол (20 мМ каждого).

При использовании H_2 в качестве субстрата, он входил в состав газовой фазы в смеси с CO_2 в соотношении 4:1.

В качестве акцепторов электронов были использованы нитрат, нитрит, тиосульфат, сульфит фумарат (10 мМ каждого, в форме Na солей), сульфат натрия (14 мМ), элементарная сера (5 г/л) O_2 (3.0 или 20% об./об. в газовой фазе).

3.2.3. Получение чистых культур

Накопительные культуры получали путем внесения природного образца (10% об.) в культивационную среду и последующей инкубации при температуре 30 °С в темноте. После трёх успешных 10 % пересевов накопительную культуру очищали методом последовательных десятикратных разведений в жидкой среде, повторённых трижды. Культуру в последнем разведении, показавшем рост, проверяли на чистоту. Чистоту культуры контролировали регулярным микроскопированием при различных условиях культивирования и секвенированием гена 16S рРНК.

3.2.4. Исследование морфологии и тонкого строения клеток

Световая микроскопия. Рост клеток и клеточная морфология были исследованы с использованием светового микроскопа Olympus CX-41 с фазово-контрастным устройством.

Клетки считали в 10 полях зрения светового микроскопа (диаметр 0.17 мм), после чего определяли среднее значение. Препарат готовили путём помещения 2 мкл среды под покровное стекло. Численность клеток в 1 мл среды рассчитывали по следующей формуле:

$$X = \frac{N \cdot S \cdot 10^9}{\pi \cdot R^2 \cdot V},$$

где X – количество клеток в 1 мл среды, N – среднее количество клеток в поле зрения, S – площадь стекла в мм², R – радиус поля зрения в мкм, V – объём капли в мкл (Фролов, 2017).

Трансмиссионная электронная микроскопия. Данная работа была проведена совместно с сотрудником ФИЦ Биотехнологии РАН Кострикиной Н.А. Исследование тонкого строения клеток проводили с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100C (Jeol, Токуо, Япон). Препараты целых клеток окрашивали фосфовольфрамовой кислотой с pH 3,5.

Ультратонкие срезы получали на микротоме LKB-3R. Далее проводили окрашивание 3% водным раствором уранилацетата с использованием стандартных методов фиксации клеток и окраски срезов (Фролов, 2017).

3.2.5. Диапазоны температуры, pH, концентрации NaCl

Температурный диапазон роста микроорганизмов определяли в анаэробной жидкой среде, используя термостаты, установленные на различные (6 – 80 °C) температуры. Диапазон солёности и pH определяли при оптимальной температуре роста. Для определения диапазона солёности навески NaCl вносили в жидкую среду до стерилизации. Рост исследовали при концентрации NaCl до 7,0% (вес/об). Для определения диапазона pH

различные значения pH создавали в пробирках непосредственно перед засевом путём добавления стерильных анаэробно приготовленных растворов 2 М HCl или 5 % NaOH (вес/об). Для более точного определения диапазона pH использовали следующие буферы: HEPES (pH 7,0 – 7,5), Tricine (pH 8,0 – 8,5), CAPSO (pH 9,0 – 9,5) и CAPS (pH 10,0 – 11,0). Измерения pH проводились при комнатной температуре с помощью pH метра (OHAUS Starter 2100) и индикаторной тест-полоски (Merck, Германия).

3.2.6. Использование доноров и акцепторов электронов

Растворимые субстраты и акцепторы электронов добавляли в пробирки Хангейта из стерильных, анаэробно приготовленных стоковых растворов перед засевом. Нерастворимые субстраты и элементную серу добавляли в пробирки перед стерилизацией. Для тестирования молекулярного водорода в качестве донора электронов газовую фазу герметично закрытых пробирок заполняли смесью H₂/CO₂ в соотношении 80:20 (об). Небольшие количества газообразных доноров и акцепторов электронов (H₂, O₂) добавляли в газовую фазу закрытых пробирок (бутылок) стерильно шприцом.

3.2.7. Аналитические методы

Образование H₂S определяли колориметрическим методом с N,N-диметилпарафенилендиамином в модификации Трюпера и Шлегеля (Trüper, Schlegel, 1964) по развитию сине-голубой окраски с последующим определением на спектрофотометре (Beckman, модель 35) при $\lambda = 670$ нм.

Газообразные продукты метаболизма определяли с помощью газового хроматографа с колонкой HayeSep N 80/100 при комнатной температуре и скорости потока 20 мл/мин (газ-носитель – аргон). *Анализ короткоцепочечных органических кислот, спиртов, сахаров* проводили в группе хроматографии ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с помощью ионного хроматографа Stayer (Aquilon, РФ) с рефрактометрическим детектором (Knauer, ФРГ) и колонкой Aminex HPLX-87H (Bio-Rad, США) с

использованием в качестве подвижной фазы 5 мМ H₂SO₄ со скоростью потока 0.6 мл/мин.

Концентрации нитрата и сульфата определяли методом HPLC на том же приборе с использованием колонки IonPack AS4-ASC (Dionex) и детектором по проводимости.

3.2.8. Хемотаксономический анализ

Клетки для хемотаксономического анализа выращивали при оптимальных условиях до ранней стационарной фазы роста и собирали центрифугированием. Хемотаксономический анализ проводился к.х.н. Новиковым А.А. на базе РГУ нефти и газа имени И.М. Губкина.

Анализ клеточных жирных кислот, входящих в состав липидов был проведён с помощью метода хромато-масс-спектрометрии (Thermo Scientific Trace GC Ultra DSQ II, HP-5MS column, EI 70 eV) производных метилового эфира, полученных из 5 мг лиофилизированного клеточного материала, предварительно обработанного безводной смесью HCl/MeOH (Mori et al., 2003). Содержание клеточных жирных кислот определяли в процентах от площади пика общего количества ионов. Качественный анализ полярных липидов был определён с использованием хроматографии на by 2D-TLC, следуя методике, описанной ранее (Slobodkina et al., 2013).

3.2.9. Выделение ДНК

Для выделения ДНК из чистых и накопительных культур использовали набор FastDNA Spin Kit for Soil (MP BioMedicals, США), следуя инструкциям производителя.

Фрагменты генов 16S рРНК были получены путем прямой амплификации геномной ДНК. Использовали универсальный праймер Uni515F (Weisburg et al., 1991), содержащий CG-clamp на 5` конце (Muyzer, Waal de, Uitterlinden, 1993) в паре с Bacteria специфичным праймером Bac-907R (Muyzer et al., 1995). Реакции амплификации проводили в смеси с

конечным объемом 50 мкл, содержащей: 50-100 нг матричной ДНК, 5 пмоль каждого праймера, 12.5 нмоль каждого трифосфат дезоксирибонуклеотида, 3.0 ед. активности *Taq* ДНК полимеразы в 5 мкл 10-кратного реакционного буфера. Реакции проводили согласно стандартному протоколу ПЦР амплификации для получения фрагментов ДНК (Muyzer, Waal de, Uitterlinden, 1993). Во всех экспериментах в качестве отрицательного контроля использовали реакцию без добавления ДНК. Амплификации проводили на многоканальном амплификаторе ДНК Терцик (ДНК-технология, Россия).

Для визуализации ДНК использовали электрофорез в 1 % агарозном геле при напряжённости электрического поля 7 В/см. Окрашивание геля производилось 0,1 % водным раствором бромистого этидия. Визуализация результатов проводилась с использованием трансиллюминатора с длиной волны 312 нм (Фролов, 2017).

3.2.10. Филогенетический анализ

Полученные продукты ПЦР очищали при помощи набора реагентов Wizard PCR Prep Kit (Promega, США), следуя протоколу производителя. Ген 16S рРНК был секвенирован в прямом и обратном направлении с использованием праймеров 27F, 357F, 530F, 1114 F, 342R, 519R, 1492R (Weisburg et al., 1991) на автоматическом секвенаторе в Центре коллективного пользования ФИЦ Биотехнологии РАН. Нуклеотидную последовательность гена собирали из полученных фрагментов длиной 500-800 п.н., используя программу BioEdit Sequence Alignmnet Editor (Hall, 1999). Сравнение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК, содержащихся в базе данных GenBank NCBI (Benson et al., 2000), проводили при помощи программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1997) и сервера EzBio-Cloud (Yoon et al., 2017), www.ezbiocloud.net). Выравнивание последовательностей генов 16S рРНК выбранных родственных микроорганизмов и построение филогенетических

деревьев, основанных на сравнении последовательности гена 16S рРНК, было осуществлено в программе MEGA 7 (Kumar, Stecher, Tamura, 2016) с помощью программы ClustalW. Консенсусные филогенетические деревья из 1000 повторностей получали с использованием метода Maximum Likelihood, базирующегося на модели Tamura-Nei (Hasekani-Covo, Graur, 2005). Филогенетическое положение изолятов также подтверждали благодаря конкатенированным неполным аминокислотным последовательностям бактериальных консервативных белков. 120 бактериальных маркерных генов, использованные для филогенетического анализа, были взяты из Genome Taxonomy Database (GDTB) (Parks et al., 2022), идентифицированы в исследуемых геномах с помощью Prodigal v2.6.3 (Hyatt et al., 2010) и выровнены с помощью MAFFT v7.427 (Nakamura et al., 2018). Полученные выравнивания были автоматически обрезаны с помощью trimAl 1.2 (Capella-Gutiérrez, Silla-Martínez, Gabaldón, 2009). Филогенетическое дерево строили на основе конкатенированных последовательностей с использованием PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010).

3.2.11. Секвенирование и анализ полного генома

Полногеномное секвенирование проводилось к.б.н. Меркелем А.Ю. (ФИЦ Биотехнологии РАН) с использованием платформы Illumina MiSeq согласно протоколам производителя. Значения ANI, AAI и *in silico* DDH рассчитывались с помощью серверов EzBio-Cloud, AAI калькулятора и калькулятора геномных расстояний, соответственно (Meier-Kolthoff et al., 2013; Rodriguez-R, Konstantinidis, 2016; Yoon et al., 2017). Статистика геномной сборки проводилась с помощью Quast (v5.0.2 - <https://github.com/ablab/quast>). Полноценность генома и возможная контаминация контролировались при помощи SPAdes v. 3.13.0 (Bankevich et al., 2012). Геном анализировался и аннотировался в онлайн версии сервера RAST software (v2.0 <http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>) (Brettin et al., 2015). Встроенная программа SEED viewer (Overbeek et al., 2014) использовали для отнесения генов с предсказанными функциями к категориям подсистем.

Поиск функциональных гомологов предсказанных CDS осуществлялся с помощью NCBI (v2.10.0+) и баз данных UniProtKB (версия 2020_02).

3.2.12. Оценка распространённости новых микроорганизмов

Оценка географического распространения новых таксонов проводилась с использованием базы данных GenBank и алгоритма BLASTn. Организмы, имеющие сходство генов 16S рРНК не менее 95%, считались представителями одного рода (Tindall et al., 2010; Yarza et al., 2014), в то время как принадлежность к одному виду определялась значением сходства генов 16S рРНК не менее 98,7% (Chun et al., 2018). Анализировались последовательности генов 16S рРНК длиной не менее 1400 пар нуклеотидов.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе выполнения работы были выделены 6 чистых культур анаэробных микроорганизмов. По результатам секвенирования гена 16S рРНК штамм F-2et принадлежал к виду *Desulfovibrio psychrotolerans*, остальные 5 штаммов принадлежали к новым видам (Табл. 10).

Диапазоны pH, температуры и солености для роста всех штаммов соответствовали параметрам окружающей среды, что позволяет предположить их принадлежность к автохтонной микрофлоре. Метаболический потенциал, закодированный в геномах всех штаммов, соответствовал фенотипическим данным.

Таблица 10. Микроорганизмы, выделенные из НГВ в ходе настоящего исследования

Штамм	Источник выделения	Субстраты для выделения	Ближайший родственный организм/порядок	Сходство генов 16S рРНК (%)
Сульфатовосстанавливающие микроорганизмы				
F-1	M01	Лактат/сульфат	<i>Pseudodesulfovibrio aespoeensis</i>	98,05
F-2et	M01	Этанол/сульфат	<i>Desulfovibrio psychrotolerans</i>	99,46
Микроорганизмы, сбраживающие углеродные соединения				
F-3ap	M01	Пируват	<i>Natranaerovirga pectinivora</i>	91,06
FN5suc	M03	Сахароза	<i>Petrocella atlantisensis</i>	98,4
H1	M04	Пируват	<i>Desulfobotulus mexicanus</i>	98,15
Нитратвосстанавливающие микроорганизмы				
T05b	M05	Лактат/нитрат	<i>Sulfurospirillum alkalitolerans</i>	98,61

4.1 Выделение и описание новой алкалофильной анаэробной бактерии, сбразживающей углеродные соединения *Anaerotalea alkaliphila* gen. nov., sp. nov.

Штамм F-3ар^T был выделен из образцов грязи активного грифона НГВ Гнилая гора (г. Темрюк, Краснодарский край, РФ) с пируватом в качестве ростового субстрата.

4.1.1. Морфология клеток штамма F-3ар^T

Клетки штамма F-3ар^T представляли собой неподвижные палочки с закруглёнными краями, 0,3-0,4 мкм толщиной и 1,5-2,5 мкм длиной, растущие одиночно или образуя длинные цепи (до 5-6 клеток) в позднеэкспоненциальной фазе. Образование эндоспор не наблюдалось на протяжении 30 суток культивирования. Клетки окрашивались по Граму положительно как в экспоненциальной, так и стационарной фазах роста. Ультратонкие срезы выявили, что штамм F-3ар^T обладает Грам-положительным типом клеточной стенки (Рис. 3).

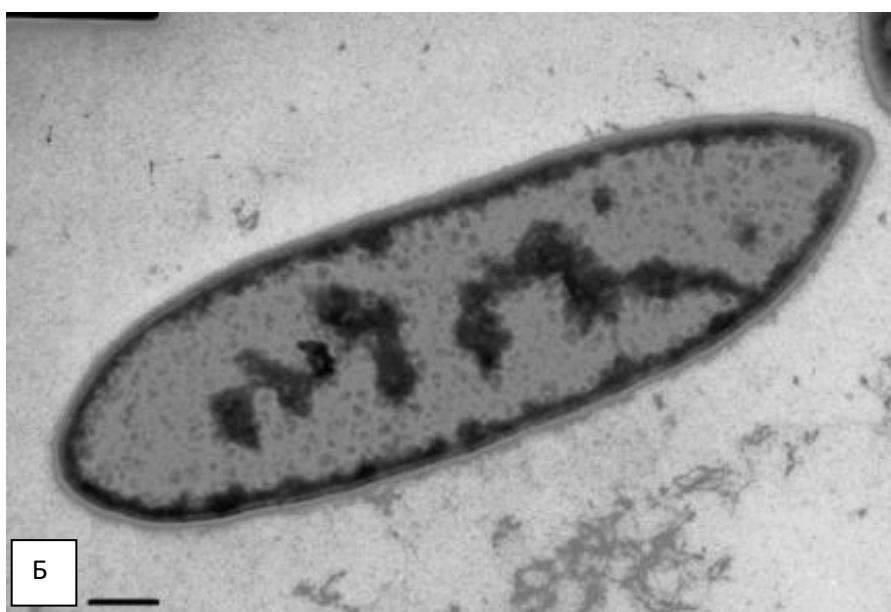
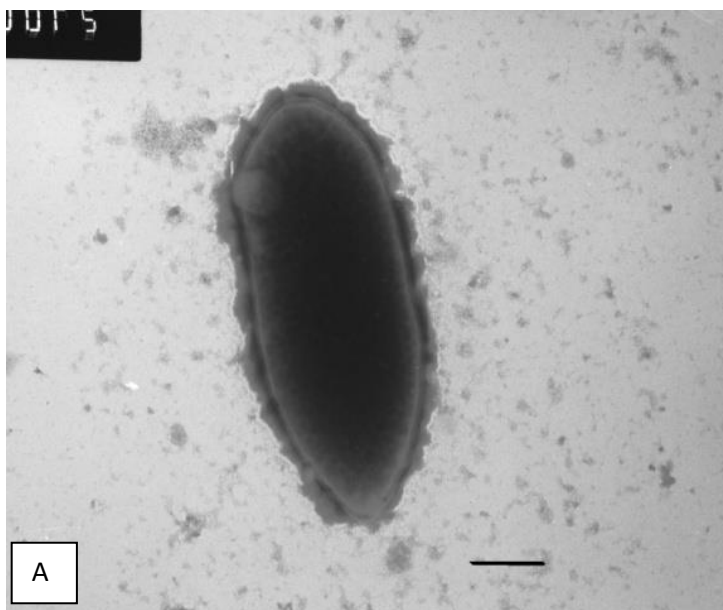


Рисунок 3. Морфология и ультраструктура клеток *Anaerotalea alkaliphila* F-3apT: (А) электронная микроскопия, препараты целых клеток (окраска фосфовольфрамовой кислотой), длина масштабной линейки – 0,375 мкм; (Б) электронная микроскопия, ультратонкие срезы (окраска уранилацетатом), длина масштабной линейки – 0,4 мкм.

4.1.2. Характеристики роста штамма F-3ap^T

Штамм F-3ap^T рос при температурах от 14 до 42°C, с оптимумом роста при 37°C. Рост не наблюдался при 50°C и выше и при 10°C и ниже при инкубации в течение 3х недель. Диапазон рН для роста составлял 7,5 – 11,0, (оптимум 9,0) (Рис. 4), роста не отмечалось при рН 7,0 или 11,5. Штамм F-3ap^T рос при концентрации NaCl в среде от 0.001 до 6.0 % (вес/об.) с

оптимумом 0,5 – 1% (вес/об.), при концентрации NaCl выше 6,5 % (вес/об.) роста не происходило. Время удвоения в оптимальных условиях составляло 1,99 ч.

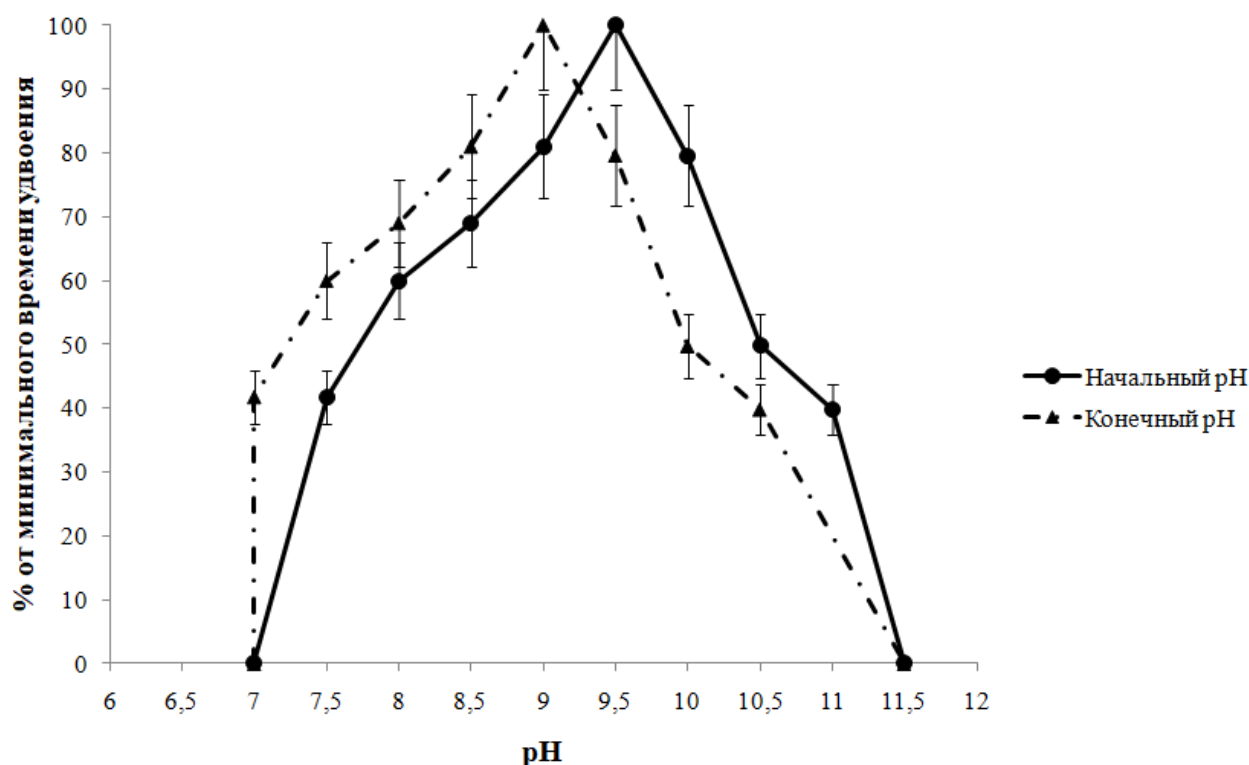


Рисунок 4. Влияние pH на скорость роста штамма F-3ap^T (при 37 °C).

4.1.3. Метаболизм штамма F-3ap^T

Штамм F-3ap^T сбраживал D-фруктозу (5 мМ), галактозу (10 мМ), D-глюкозу (5 мМ), лактозу, мальтозу (10 мМ каждый), пектин (1 г/л), раффинозу (10 мМ), крахмал (1 г/л), сахарозу, трегалозу, D-ксилозу, пируват, цитрат (10 мМ каждый), полигалактуроновую кислоту, галактуроновую кислоту, альгинат (1 г/л) и дрожжевой экстракт (1 г/л каждого субстрата). Конечными продуктами сбраживания глюкозы (10 мМ) являлись этанол (6,25 мМ), CO₂ и H₂, в то время, как ацетат обнаруживался в следовых концентрациях (< 0,75 мМ). Добавление дрожжевого экстракта 200 мг/л не стимулировало рост клеток штамма F-3ap^T.

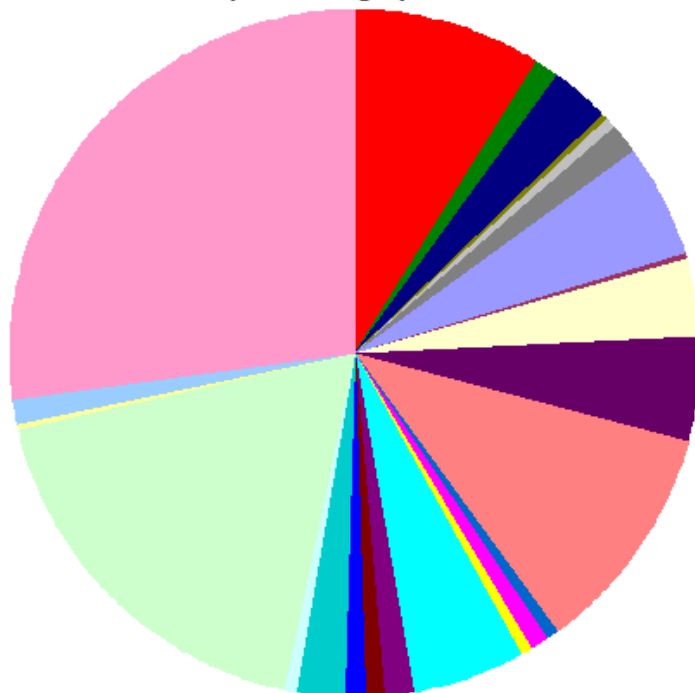
Штамм F-3ар^T не использовал целлобиозу (20 мМ), маннозу, рибозу (10 мМ каждого), ксилан (1 г/л), формиат, фумарат (20 мМ каждого), сукцинат, лактат (10 мМ каждого), малат (5 мМ), метанол, этанол (10 мМ каждого), пептон и триптон (1 г/л каждого) в качестве доноров электронов. Штамм F-3ар^T не использовал сульфат (14 мМ), сульфит (5 мМ), тиосульфат (15 мМ), элементную серу (5 г/л), нитрат (10 мМ), нитрит (2,5 мМ) и ферригидрит (90 ммоль Fe(III)/л) в качестве акцепторов электронов с пируватом (10 мМ) в качестве донора электронов.

4.1.4. Состав жирных кислот и липидов мембран штамма F-3ар^T

Анализ клеточных жирных кислот штамма F-3ар^T показал преобладание насыщенных прямоцепочечных кислот. Основной кислотой являлась C_{16:0} (74,6% от общего количества жирных кислот). В меньшем количестве присутствовали C_{16:1} (11,7 %) и C_{14:0} (2,3 %). Также были обнаружены диметилацетали. Основными полярными липидами штамма F-3ар^T являются PG и три неидентифицированных липида UL, PL1, PL2.

4.1.5 Геносистематические характеристики штамма F-3ар^T

Геном штамма F-3ар^T был собран в 94 контиг общей длиной 2.980.040 п.о. Содержание Г+Ц пар *in silico* составило 56,78 %. В геноме была обнаружена одна молекула 16S-23S-5S. Согласно веб-серверу автоаннотации RAST, геном штамма F-3ар^T содержал 2944 гена, кодирующих белок и 52 гена РНК. Большинство аннотированных генов были ответственны за метаболизм углеводов (278), синтез аминокислот и их производных (186), метаболизм белков (113) (Рис. 5).

Subsystem Coverage**Subsystem Category Distribution****Subsystem Feature Counts**

- ☒ Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments (92)
- ☒ Cell Wall and Capsule (12)
- ☒ Virulence, Disease and Defense (29)
- ☒ Potassium metabolism (3)
- ☒ Photosynthesis (0)
- ☒ Miscellaneous (6)
- ☒ Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids (14)
- ☒ Membrane Transport (54)
- ☒ Iron acquisition and metabolism (4)
- ☒ RNA Metabolism (37)
- ☒ Nucleosides and Nucleotides (51)
- ☒ Protein Metabolism (113)
- ☒ Cell Division and Cell Cycle (4)
- ☒ Motility and Chemotaxis (0)
- ☒ Regulation and Cell signaling (10)
- ☒ Secondary Metabolism (5)
- ☒ DNA Metabolism (56)
- ☒ Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids (14)
- ☒ Nitrogen Metabolism (9)
- ☒ Dormancy and Sporulation (2)
- ☒ Respiration (11)
- ☒ Stress Response (24)
- ☒ Metabolism of Aromatic Compounds (5)
- ☒ Amino Acids and Derivatives (186)
- ☒ Sulfur Metabolism (3)
- ☒ Phosphorus Metabolism (11)
- ☒ Carbohydrates (278)

Рисунок 5. Распределение по категориям подсистем основных генов, кодирующих белок штамма F-3ap^T, аннотированных сервером аннотаций RAST. Гистограмма показывает охват подсистемы в процентах (зеленая полоса соответствует проценту белков, включенных в подсистему, а синяя полоса соответствует проценту белков, не включенных в подсистему). Круговая диаграмма показывает процентное распределение наиболее распространенных категорий подсистем.

4.1.5.1. Анализ генома штамма F-3ap^T

Штамм F-3ap^T содержал в своём геноме все необходимые гены гликолиза/глюконеогенеза (здесь и далее Табл. П1). Путь Энтнера-Дудорова и пентозофосфатный путь не полный, что является характерной особенностью ряда грамположительных бактерий. Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) не полный и представлен лишь аконитат гидратазой, цитрат лиазой, фумарат гидратазой и изоцитрат дегидрогеназой.

Способность штамма F-3ap^T использовать пятиуглеродные моносахариды в качестве донора электронов подтверждает присутствие в его геноме трёх генных кластеров, кодирующих ксилулозо киназу, одного из ключевых ферментов преобразования D-ксилозы и L-арабинозы, и ксилулоизомеразу, фермента, кодирующего взаимопреобразования D-ксилозы и D-ксилулозы. Образование штаммом F-3ap^T этанола в ходе ферментации углеродных соединений обеспечивалось алкогольдегидрогеназой, кодирующейся шестью наборами генов с высокой идентичностью последовательностей.

Геном штамма F-3ap^T содержал также кластер из восьми генов, кодирующих ферментный комплекс нитрогеназы (*nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE*, *nifB*, *nifN* и два гена азотной регуляции семейства P-II), подтверждая тем самым способность данного микроорганизма к фиксации N₂. Кластер генов тетрамерной (Fe–Fe) гидрогеназы, гомологичной *hndA*, *hndB*, *hndC*, *hndD*, кодирующие цитозольную НАДФ-восстанавливающую гидрогеназу у *Desulfovibrio fructosivorans*, содержится в геноме штамма F-3ap^T. Также была обнаружена дополнительная гидрогеназа, гомологичная дикластерной группе 4Fe–4S периплазматической гидрогеназы, обнаруженная в геномах многих анаэробных *Firmicutes*. Геном штамма F-3ap^T содержал многочисленные гены транспозаз и интеграз.

Ген спорообразования стадии 0 A (*spo0A*), который считается одним из молекулярных маркеров образования эндоспор, отсутствовал в геноме штамма F-3ap^T. Гены, кодирующие флагеллярные белки (*FlgH*, *FlgI* и *FlgF*) не были обнаружены в геноме штамма F-3ap^T.

4.1.5.2. Филогенетическое положение штамма F-3ap^T

Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК штамма F-3ap^T, полученные путём амплификации с универсальными бактериальными праймерами и из полногеномных данных, были идентичными. Сравнение 1517 нуклеотидов гена 16S рРНК штамма F-3ap^T с нуклеотидными последовательностями баз данных NCBI и EzBio Cloud показало, что новый изолят принадлежит к порядку *Clostridiales*, классу *Clostridia*, филуму *Firmicutes*. Ближайшими родственными штамму F-3ap^T микроорганизмами являются *Natranaerovirga pectinivora* (90,97%), *Abyssivirga alkaniphila* (90,50%) и *Petrocella atlantisensis* (90,42%). Реконструкция филогенетического дерева гена 16S рРНК штамма F-3ap^T показала, что штамм представляет собой монофилетическую ветвь, четко отделенную от наиболее близких видов (Рис. 6).

Полногеномное филогенетическое древо, основанное на контагенированных частичных аминокислотных последовательностях 120 бактериальных консервативных белков, показало, что штамм F-3ap^T отделен от других родов и формирует отдельную линию рядом с представителями семейства *Vallitalaceae* (Рис. 7).

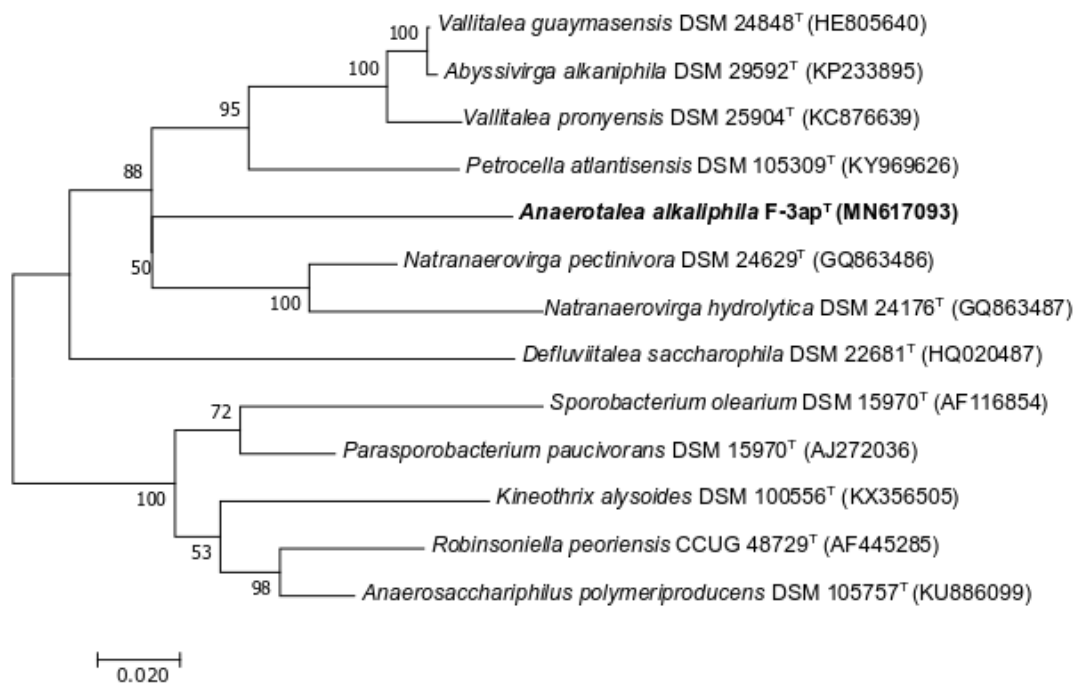


Рисунок 6. Филогенетическое дерево, построенное на основании нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, показывающее положение штамма F-3ap^T и ближайших родственных организмов. Длина масштабной линейки соответствует 2 % различия последовательностей.

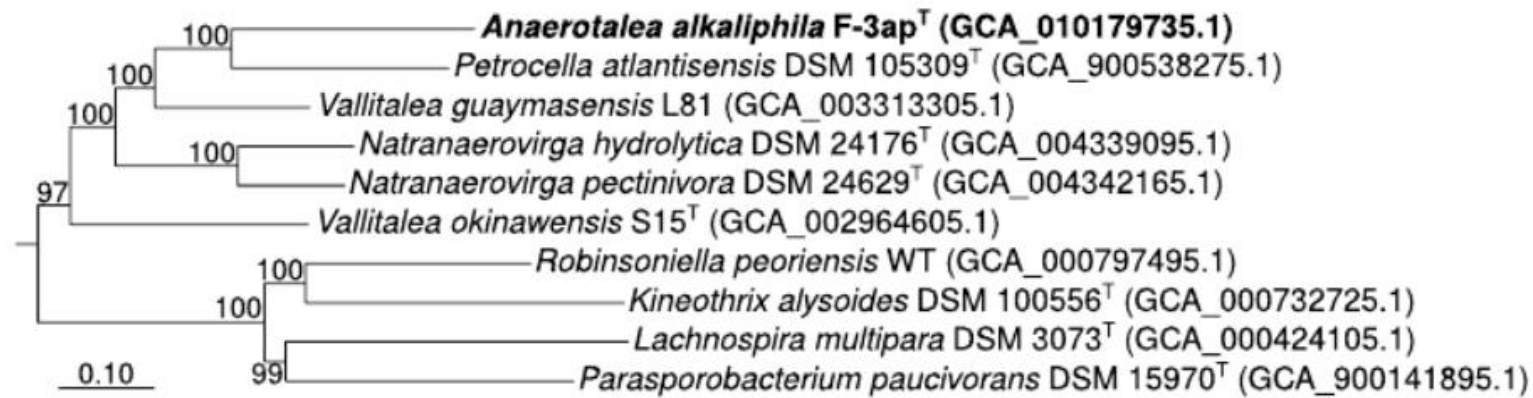


Рисунок 7. Филогенетическое дерево, построенное на основании контагенированных неполных аминокислотных последовательностей 120-ти бактериальных консервативных белков. Длина масштабной линейки соответствует 1% различия последовательностей.

Значения ANI и *in silico* ДНК-ДНК гибридизации между штаммом F-3ap^T и родственными ему таксонами находились в диапазоне 66 – 69 % и 27 – 40 %, соответственно, что значительно ниже порога разграничения видов (Табл. 11 и 12).

Таблица 11. Попарное сравнение значений ANI (в процентах) в геномах штамма F-3ap^T и родственных ему представителей порядка *Clostridiales*

Штамм	F-3ap ^T	<i>Natranaerovirga pectinivora</i>	<i>Natranaerovirga hydrolytica</i>	<i>Vallitalea guaymasensis</i>	<i>Petrocella atlantisensis</i>
F-3ap ^T		68,54	69,44	67,73	66,36
<i>Natranaerovirga pectinivora</i>	68,54		73,81	69,69	67,55
<i>Natranaerovirga hydrolytica</i>	69,44	73,81		69,43	67,48
<i>Vallitalea guaymasensis</i>	67,73	69,69	69,43		68,13
<i>Petrocella atlantisensis</i>	66,36	67,55	67,48	68,13	

Таблица 12. Попарное сравнение значений *in silico* ДНК-ДНК гибридизации (в процентах) в геномах штамма F-3ap^T и родственных ему представителей порядка *Clostridiales*

Штамм	F-3ap ^T	<i>Natranaerovirga pectinivora</i>	<i>Natranaerovirga hydrolytica</i>	<i>Vallitalea guaymasensis</i>	<i>Petrocella atlantisensis</i>
F-3ap ^T		36,2	26,6	38,1	39,8
<i>Natranaerovirga pectinivora</i>	36,2		20,2	21,6	27,6
<i>Natranaerovirga hydrolytica</i>	26,6	20,2		21,4	20,8
<i>Vallitalea guaymasensis</i>	38,1	21,6	21,4		25,7
<i>Petrocella atlantisensis</i>	39,8	27,6	20,8	25,7	

Штамм F-3ap^T имел 50–54% ААI с ближайшими родственными изолятами, что является стандартным для отдельных родов (Табл. 13).

Таблица 13 Попарное сравнение значений ААI (в процентах) в геномах штамма F-3ap^T и родственных ему представителей порядка *Clostridiales*

Штамм	F-3ap ^T	<i>Natranaerovirga pectinivora</i>	<i>Natranaerovirga hydrolytica</i>	<i>Vallitalea guaymasensis</i>	<i>Petrocella atlantisensis</i>
F-3ap ^T		51,12	50,12	50,74	53,74
<i>Natranaerovirga pectinivora</i>	51,12		67,96	52,67	50,6
<i>Natranaerovirga hydrolytica</i>	50,12	67,96		52,55	50,47
<i>Vallitalea guaymasensis</i>	50,74	52,67	52,55		51,36
<i>Petrocella atlantisensis</i>	53,74	50,6	50,47	51,36	

4.1.6. Сравнение ключевых характеристик штамма F-3ap^T с представителями других родов порядка *Clostridiales*

Штамм F-3ap^T обособлен от других представителей семейства *Clostridiales* на филогенетическом дереве. Помимо этого, он отличается ещё и типом местообитания. Так, его ближайшие родственные микроорганизмы, *Natranaerovirga pectinivora* и *Natranaerovirga hydrolytica* были выделены из содовых озёр (Sorokin et al., 2012a), а все представители родов *Vallitalea* и *Petrocella* – из морских экосистем (Ben Aissa et al., 2014; Lakhali et al., 2013; Quéméneur et al., 2019).

Так же, как и представители родственных штамму F-3ap^T родов *Natranaerovirga* и семейства *Vallitaleaceae*, новый изолят представлен анаэробными мезофильными палочками с ферментативным типом метаболизма, однако штамм F-3ap^T существенно отличается диапазонами pH,

температуры и солёности, и списком утилизируемых им субстратов (Табл. 14). Так, основным продуктом брожения у штамма F-3ap^T является этанол, в то время как родственные ему микроорганизмы сбрасывают глюкозу до ацетата. Помимо вышеперечисленных признаков необходимо отметить и значительно более высокое, чем у родственных штамму F-3ap^T микроорганизмов, значение Г+Ц геномной ДНК.

Таблица 14. Отличия штамма F-3ap^T от типовых представителей родственных ему родов

Свойство	1	2	3	4
Образование эндоспор	-	+	+/-	-
Диапазон pH	7,5 – 11,0	8,0 – 10,6	6,2 – 9,5	5,6 – 9,2
Диапазон температур (°C)	14 - 42	≤ 45	14 - 42	10 - 35
Диапазон солёности	0,001 – 6,0	1,2 – 20,5	0,5 – 6,0	0 – 8,0
Используемые субстраты	Альгинат, D-фруктоза, галактоза, D-глюкоза, лактоза, мальтоза, пектин, раффиноза, крахмал, сахароза, трегалоза, D-ксилоза, пируват, цитрат, полигалактурановая кислота, галактурановая кислота, дрожжевой экстракт	D-фруктоза, D-глюкоза, мальтоза, рибоза, ацетат, формиат, полигалактурановая кислота, галактурановая кислота	D-фруктоза, D-глюкоза, мальтоза, рибоза, глицерол, лактат, дрожжевой экстракт, пептон	Целлобиоза, D-фруктоза, галактоза, D-глюкоза, лактоза, мальтоза, манноза, раффиноза, рамноза, сахароза, глицерол, манитол, пируват, дрожжевой экстракт
Основные продукты реакции	Этанол, CO ₂ , H ₂	Ацетат, формиат	CO ₂ , H ₂	Ацетат, CO ₂ , H ₂ ,

сбраживания				форма
Содержание геномной ГЦ (мол%)	56,78	30,7 – 32,0	31,2 – 36,6	37,3
Основные жирные кислоты	C _{16:0} , C _{16:1} , C _{14:0}	C _{16:0} , C _{18ω7c} , C _{16:1ω7c}	C _{15:0} , anteiso-C _{15:0} , C _{16:0}	C _{16:1ω7c} , C _{16:0} , C _{16:1ω7c} DMA
Полярные липиды	UL, PG, PL1, PL2	PD, DPG, PL, GL, APL	PG, DPG, PL, GL	PL, GL, PG, PGL
Источник выделения	Грязевой вулкан	Содовое озеро	«Чёрные курильщики»	Поддонные породы

*1. *Anaerotalea*, Штамм F-3ap^T (Frolova et al., 2021a); 2. *Natranaerovirga* (Sorokin et al., 2012a); 3. *Vallitalea* (Ben Aissa et al., 2014; Lakhali et al., 2013; Sun et al., 2019); 4. *Petrocella* (Quéméneur et al., 2019) Обозначения: +, наблюдается рост; -, рост отсутствует.

Основываясь на фенотипических свойствах и результатах филогенетического и геномного анализов, штамм F-3ap^T был валидно описан как новый род *Anaerotalea* с типовым видом *Anaerotalea alkaliphila* (Frolova et al., 2021a).

Описание *Anaerotalea* gen. nov.

Anaerotalea (An.ae.ro.ta'le.a; Gr. pref. *an*, не; Gr. fem. n. *aer aeros*, воздух; L. fem. n. *talea*, палочка; N.L. fem. n. *Anaerotalea*, анаэробная палочка).

Клетки палочковидной формы, неподвижны в оптимальных условиях роста. Клеточная стенка грамположительного типа. Мезофильные, строго анаэробные хемоорганогетеротрофы, способные сбраживать углеводы. Принадлежат к порядку *Clostridiales* внутри *Firmicutes*. Типовой вид - *Anaerotalea alkaliphila*.

Описание *Anaerotalea alkaliphila* sp. nov.

Anaerotalea alkaliphila (al.ka.li'phi.la N.L. neut. n. *alkali*, щелочь; N.L. adj. *philus* -a, -um, друг, любить от Gr. adj. *philos* -ê -on, любящий; N.L. fem. adj. *alkaliphila*, любящая щелочные условия).

Обладает следующими характеристиками в дополнение к данным для рода. Палочковидные, неподвижные клетки 0,3–0,4 μm в диаметре и 1,5–2,5 μm длиной. Рост одиночный или цепочками. Не образует эндоспоры. Рост в диапазоне температур 14–42 °С, оптимальная температура 37 °С. Диапазон pH для роста 7,5–11,0 (Рис. 4), оптимальный pH 9.0. Рост в диапазоне концентраций NaCl 0,001 – 6,0 % (вес/объем). Сбраживает альгинат, D-фруктозу, галактозу, D-глюкозу, лактозу, мальтозу, пектин, раффинозу, крахмал, сахарозу, трегалозу, D-ксилозу, пируват, цитрат, полигалактуроновую кислоту, галактуроновую кислоту и дрожжевой экстракт. Продуктами сбраживания глюкозы являются этанол, CO₂ и H₂. Не утилизирует целлобиозу, маннозу, рибозу, ксилан, формиат, фумарат, сукцинат, лактат, малат, метанол, этанол, пептон и триптон. Не восстанавливает сульфат, сульфит, тиосульфат, элементную серу, нитрат, нитрит и ферригидрит. Основные жирные кислоты C_{16:0}, C_{16:1} and C_{14:0}. Основные полярные липиды UL, PG, PL1, PL2.

Размер генома 2.980.040 п.о., содержание геномной Г+Ц ДНК 56,78 %. Идентификационный номер последовательности 16S рРНК в системе GenBank/EMBL 16S - MN617093, полногеномная последовательность депонирована в DDBJ/ENA/GenBank под номером JAAEEN000000000.

Типовой и единственный штамм F-Зар^T депонирован в Корейской коллекции микроорганизмов (Korean Culture Center of Microorganisms KCTC) под номером KCTC 15917^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером =VKM В-3406^T.

4.2. Выделение и описание новой алкалофильной анаэробной сульфатвосстанавливающей бактерии *Pseudodesulfovibrio alkaliphilus* sp. nov.

Штамм F-1^T был выделен из образцов грязи активного грифона НГВ Гнилая гора (г. Темрюк, Краснодарский край, РФ) на лактате в качестве донора и сульфате в качестве акцептора электронов.

4.2.1. Морфология клеток штамма F-1^T

Клетки штамма F-1^T представляли собой подвижные вибрионы с одиночным полярным жгутиком, 0,5 мкм толщиной и 2,0-4,0 мкм длиной. Образование эндоспор не наблюдалось на протяжении 30 суток культивирования. Клетки не окрашивались по Граму как в экспоненциальной, так и стационарной фазе роста. Ультратонкие срезы выявили, что штамм F-1^T обладает Грам-отрицательным типом клеточной стенки (Рис. 8).

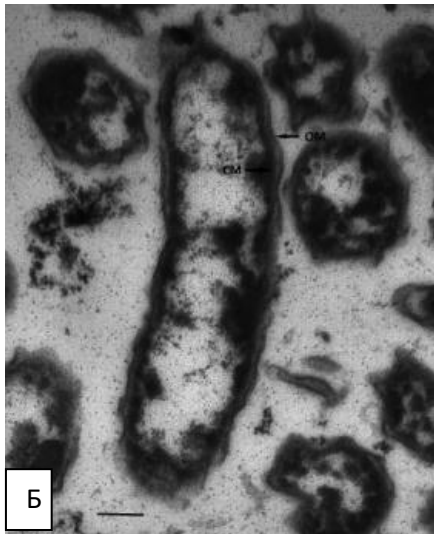
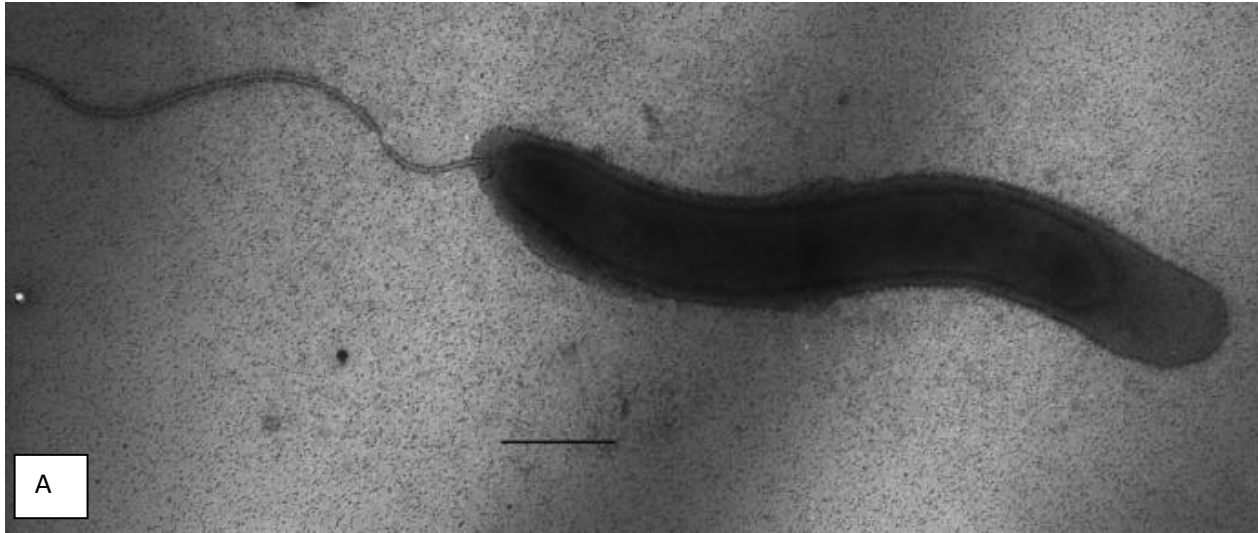


Рисунок 8. Морфология и ультраструктура клеток *Pseudodesulfovibrio alkaliphilus* F-1^T: (А) электронная микроскопия, препараты целых клеток (окраска фосфовольфрамовой кислотой), длина масштабной линейки – 0,6 мкм; (Б) электронная микроскопия, ультратонкие срезы (окраска уранилацетатом), длина масштабной линейки – 0,5 мкм.

4.2.2. Характеристики роста штамма F-1^T

Штамм F-1^T рос при температурах от 6 до 37°C, с оптимумом роста при 24°C. Рост не наблюдался при 42°C и выше и при 4°C и ниже, при инкубации в течение месяца. Диапазон pH для роста составлял 7,0 – 10,5, (оптимум 9,5) (Рис. 9), роста не отмечалось при pH 6,5 или 11,0. Штамм F-1^T рос при концентрации NaCl в среде от 0.3 до 3.0 % (вес/об.) при 3,5% NaCl и выше роста не происходило. Время удвоения в оптимальных условиях составляло 1,47 ч.

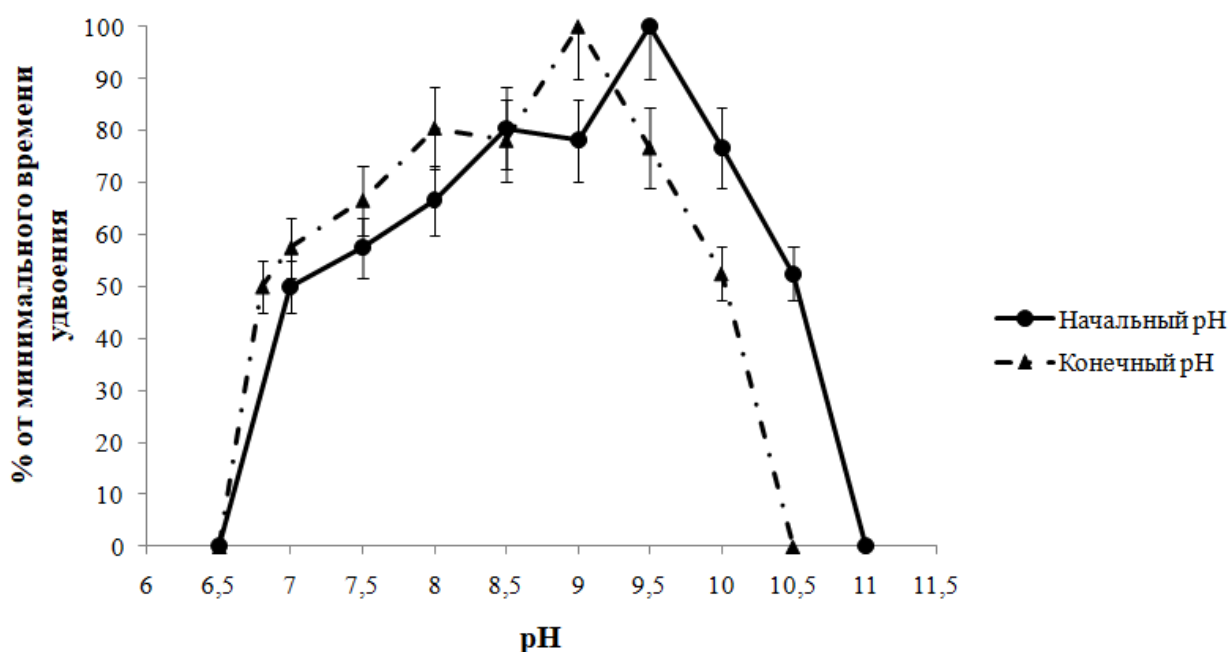


Рисунок 9. Влияние pH на скорость роста штамма F-1^T (при 25 °C).

4.2.3. Метаболизм штамма F-1^T

Штамм F-1^T использовал сульфат (14 мМ) как акцептор электронов с лактатом, фумаратом (20 мМ каждого), D-глюкозой (5 мМ), D-целлобиозой (20 мМ) и молекулярным водородом (H₂/N₂; 80/20; об/об в газовой фазе) в качестве доноров электронов. В присутствии сульфата конечными продуктами окисления лактата являлись ацетат (13 мМ), пропионат (0,8 мМ), сульфид (5 мМ) и CO₂ (0,5 мМ). Пируват (10 мМ), малат (5 мМ), формиат (20 мМ), ацетат (5 мМ), бутират (5 мМ), этанол (10 мМ), пропанол (10 мМ) и

арабиноза (10 мМ) не использовались как доноры электронов с сульфатом в качестве акцептора электронов.

Штамм F-1^T сбразивал лактат и пируват с образованием ацетата (1,6 мМ), пропионата (0,4 мМ), CO₂ (0, 11 мМ) и водорода (0,06 мМ). Фумарат, глюкоза и целлобиоза не использовались штаммом F-1^T как субстраты для роста.

Штамм F-1^T демонстрировал слабый ($5 \cdot 10^6$ кл/мл), но стабильный автотрофный рост в течение как минимум 5ти последовательных пересевов с сульфатом, сульфитом, тиосульфатом, элементной серой, фумаратом и арсенатом в качестве акцепторов электронов с молекулярным водородом (H₂/N₂; 80/20; об/об в газовой фазе) в качестве доноров электронов. Добавление ацетата (10 мМ) в качестве источника углерода при этом не стимулировало рост клеток штамма F-1^T.

Штамм F-1^T использовал сульфат (14 мМ), сульфит (2 мМ), тиосульфат (20 мМ), элементную серу (5 г/л), фумарат (20 мМ) и арсенат (5 мМ) в качестве акцепторов электронов с лактатом в качестве донора электронов. Нитрат (20 мМ), нитрит (5 мМ), селенат (5 мМ) или ферригидрит (90 ммоль Fe(III)/л) не используются штаммом F-1^T как акцепторы электронов. Штамм F-1^T не диспропорционировал сульфит (5 мМ), тиосульфат (20 мМ) и элементную серу (5 г/л).

4.2.4. Состав жирных кислот и липидов мембран штамма F-1^T

Клеточные жирные кислоты штамма F-1^T состояли из смеси насыщенных и мононенасыщенных прямоцепочечных и разветвленных (изо- и анти изо-) кислот. Основными кислотами являлись антиизо-C_{15:0} (13, 8 %), C_{16:0} (12,5 %), C_{18:0} (11,8 %) и изо-C_{17:1ω8} (12,0 %).

4.2.5 Геносистематические характеристики штамма F-1^T

Геном штамма F-1^T был собран в 29 контигов общей длиной 3.227.153 п.о. Содержание Г+Ц пар *in silico* составило 61,93 %. В геноме была обнаружена одна молекула 16S-23S-5S. Согласно веб-серверу автоаннотации RAST, геном штамма F-1^T содержал 1914 генов, кодирующих белки. Большинство аннотированных генов были ответственны за синтез аминокислот и их производных (167), метаболизм белков (155), образование кофакторов, витаминов, простетических групп и пигментов (86) (Рис. 10).

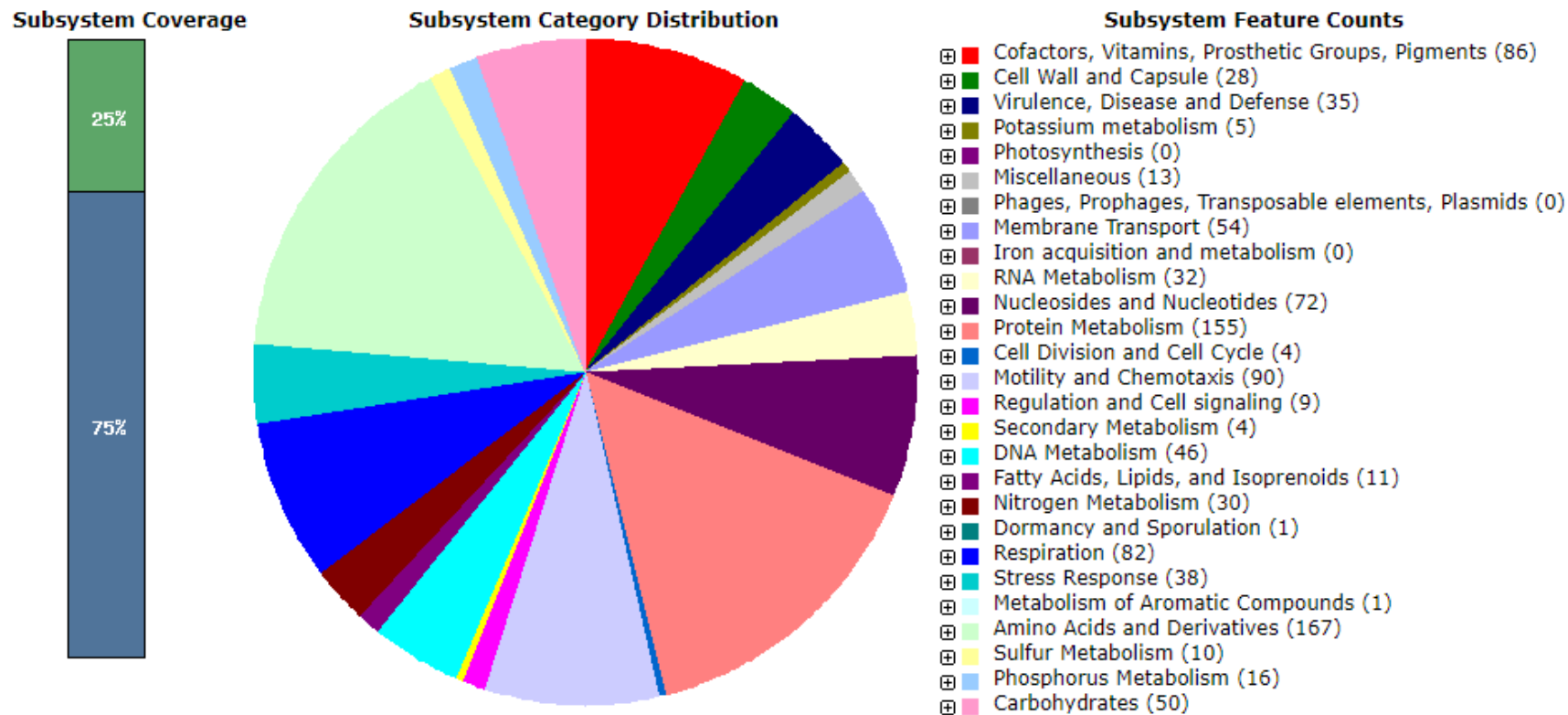


Рисунок 10. Распределение по категориям подсистем основных генов, кодирующих белок штамма F-1^T, аннотированных сервером аннотаций RAST. Гистограмма показывает охват подсистемы в процентах (зеленая полоса соответствует проценту белков, включенных в подсистему, а синяя полоса соответствует проценту белков, не включенных в подсистему). Круговая диаграмма показывает процентное распределение наиболее распространенных категорий подсистем.

4.2.5.1. Анализ генома штамма F-1^T

Геном штамма F-1^T содержал полный набор генов, необходимых для осуществления диссимиляционной сульфатредукции (референсы здесь и далее даны в Табл. П2). В геноме штамма F-1^T были представлены все гены пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса.

Несмотря на способность штамма F-1^T к автотрофному росту, в его геноме отсутствовали ключевые ферменты 6-ти известных к моменту начала работ автотрофных путей. Недавно описанный восстановительный глициновый путь (Sánchez-Andrea et al., 2020; Song et al., 2020) в геноме штамма F-1^T был представлен в неполном виде. В геноме штамма F-1^T присутствовали все гены цикла трикарбоновых кислот, включая цитрат синтазу, аконитазу, изоцитрат дегидрогеназу, сукцинил-КоА синтетазу, фумаразу, сукцинат дегидрогеназу/фумарат редуктазу, фумарат гидратазу и малат дегидрогеназу. Вероятно, фиксация CO₂ штаммом F-1^T происходит через «обратный окислительный цикл трикарбоновых кислот» (Mall et al., 2018; Nunoura et al., 2018).

Геном штамма F-1^T кодировал две субъединицы периплазматической гидрогеназы НунАВ, что подтверждало способность данного микроорганизма использовать молекулярный водород как источник энергии. Присутствие в геноме штамма F-1^T двух копий гена арсенат редуктазы, *arsC*, по-видимому, является общей чертой представителей рода *Pseudodesulfovibrio*, однако на момент начала исследований не сообщалось о способности данных микроорганизмов расти, используя арсенат в качестве акцептора электронов. Обычно фумарат редуктаза/сукцинат дегидрогеназа состоит из 4х субъединиц (*frdABCD*), однако в геноме штамма F-1^T, как и в геномах *Desulfovibrio vulgaris* и *Desulfovibrio desulfuricans* (Zaunmüller et al., 2006), она была представлена лишь тремя (*frdABC*).

Геном штамма F-1^T содержал гены нитрогеназного комплекса *nifDHK*, ответственного за фиксацию N₂, две субъединицы железосодержащего белка, молибден-железный белок и два гена азотных регуляторов семейства P-II.

4.2.5.2. Филогенетическое положение штамма F-1^T

Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК штамма F-1^T, полученные путем амплификации с универсальными бактериальными праймерами и в ходе полногеномного секвенирования были идентичны. Сравнение 1541 нуклеотида последовательности гена 16S рРНК штамма F-1^T с нуклеотидными последовательностями, размещенными в базе данных GenBank (Benson et al., 2000) и EzBio Cloud (Yoon et al., 2017) показали, что изолят принадлежит к роду *Pseudodesulfovibrio* с 98,05 % сходства с геном 16S рРНК с *P. aespoeensis* DSM 10631^T. Реконструкция филогенетического дерева гена 16S рРНК показала, что штамм F-1^T представляет собой монофилетическую ветвь, четко отделенную от наиболее близких видов (Рис. 11).

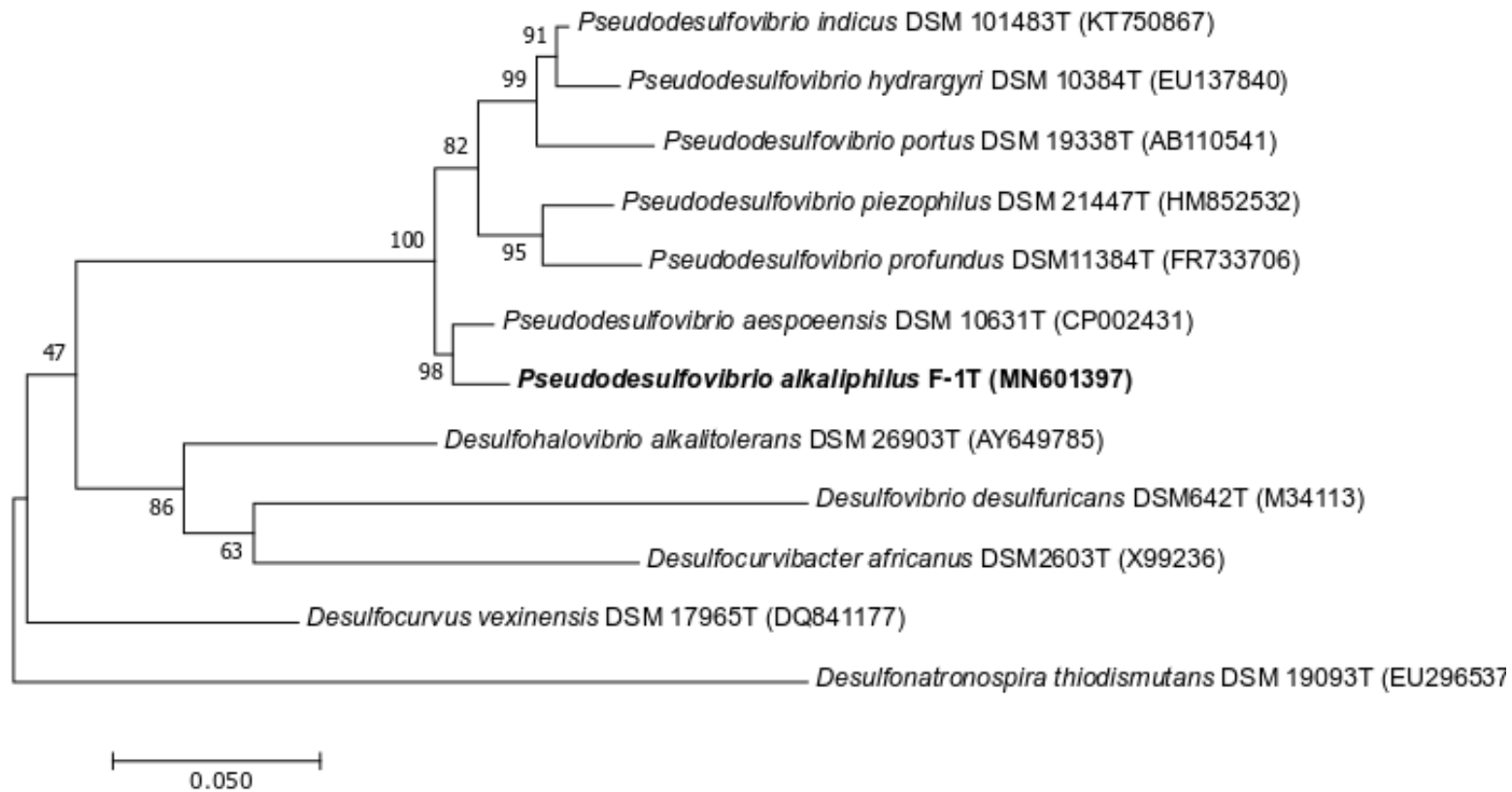


Рисунок 11. Филогенетическое дерево, построенное на основании нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК, показывающее положение штамма F-1^T и ближайших родственных организмов. Длина масштаб линейки соответствует 5 % различия последовательностей.

Значения ANI и *in silico* ДНК-ДНК гибридизации между штаммом F-1^T и *P. aespoeensis* составляли 82,07 % и 24,5 %, соответственно, что значительно ниже порога разграничения видов.

4.2.6. Сравнение ключевых характеристик штамма F-1^T с другими представителями рода *Pseudodesulfovibrio*

Штамм F-1^T обособлен от других представителей рода *Pseudodesulfovibrio* на филогенетическом дереве. Значения ANI и *in silico* ДНК-ДНК гибридизации между штаммом F-1^T и *P. aespoeensis* также позволяют отнести изолят к новому виду. Штамм F-1^T является первым представителем рода *Pseudodesulfovibrio*, выделенным из наземных местообитаний – остальные представители рода были выделены из подводных или подземных местообитаний.

Как и все представители рода *Pseudodesulfovibrio*, штамм F-1^T является анаэробным мезофильным сульфатвосстанавливающим вибрионом, однако от родственных ему микроорганизмов он существенно отличается диапазонами и оптимумами pH, температуры и солёности, а также используемыми для роста субстратами (Табл. 15). Особого внимания заслуживает тот факт, что все представители рода *Pseudodesulfovibrio* являются нейтрофилами, имея оптимум pH около 7,0, в то время как новый изолят является облигатным алкалофилом и имеет оптимум pH 9,5.

Основываясь на фенотипических свойствах и результатах филогенетического и геномного анализов, штамм F-1^T, выделенный из наземного грязевого вулкана, был валидно описан как новый вид, которому было дано название *Pseudodesulfovibrio alkaliphilus* (Frolova et al., 2021b).

Описание *Pseudodesulfovibrio alkaliphilus* sp. nov.

Pseudodesulfovibrio alkaliphilus (al.ka.li.phi`lus M.L. n. *alkali* щелочь; N.L. masc. adj. *philus* (от Gr. masc. adj. *philos*) любящий; N.L. musc. adj. *alkaliphilus* любящий щелочные условия)

Клетки являются подвижными вибрионами 2,0 – 4,0 μm длиной и 0,5 μm диаметром с полярным жгутиком (Рис. 6). Растет в диапазоне концентраций NaCl от 0,3 до 3% (вес/объем) (оптимум 0,5 – 1%, вес/объем), диапазоне pH 7,0 – 10,5 (оптимум 9,5) (Рис. 7), и при температуре между 6 и 37 °C (оптимум 24 °C). Растет с сульфатом в качестве акцептора и лактатом, фумаратом, D-глюкозой, D-целлобиозой или молекулярным водородом в качестве донора электронов. В присутствии сульфата конечными продуктами окисления лактата являются ацетат, пропионат, H₂S и CO₂. Сульфит, тиосульфат, элементная сера, фумарат и арсенат используются в качестве акцепторов электронов с лактатом в качестве донора электронов, но нитрат, нитрит, селенат и ферригидрит не используются. Пируват, малат, формиат, ацетат, бутират, этанол, пропанол и арабиноза не используются в качестве доноров электронов с сульфатом в качестве акцептора. В отсутствие сульфата лактат и пируват сбразиваются и используются в качестве единственного субстрата для роста с образованием ацетата. Фумарат, D-глюкоза и D-целлобиоза не утилизируются. Способен к слабому, но устойчивому автотрофному росту с сульфатом, сульфитом, тиосульфатом, элементной серой, фумаратом или арсенатом в качестве акцепторов электронов и молекулярным водородом в качестве донора электронов. Не диспропорционирует сульфит, тиосульфат и элементную серу Основными жирными кислотами являются anteiso-C_{15:0}, C_{16:0}, C_{18:0}, и iso-C_{17:1 ω 8}.

Размер генома составляет 3.227.153 п.о, а содержание геномной Г+Ц ДНК - 61,93 %. Идентификационный номер последовательности 16S рРНК в системе GenBank/EMBL - MN601397, полногеномная последовательность депонирована в DDBJ/ENA/GenBank под номером WODC00000000.

Типовой и единственный штамм F-1^T депонирован в Корейской коллекции микроорганизмов (Korean Culture Center of Microorganisms KCTC) под номером KCTC 15918^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером =VKM В-3405^T.

Таблица 15. Дифференцирующие характеристики штамма F-1^T и остальных представителей рода *Pseudodesulfovibrio*

Таха: 1, *Pseudodesulfovibrio alkaliphilus*, sp. nov. F-1^T (Frolova et al., 2021b); 2, *P. aespoeensis* (Fichtel et al., 2012; Motamedi, Pedersen, 1998); 3, *P. indicus* (Cao et al., 2016); 4, *P. piezophilus* (Khelaifia et al., 2011); 5, *P. profundus* (Bale et al., 1997); 6, *P. portus* (Suzuki et al., 2009); 7, *P. hydrargyri* (Ranchou-Peyruse et al., 2018); 8, *P. halophilus* (Caumette, Cohen, Matheron, 1991); 9, *P. oxyclinae* (Ben Ali Gam et al., 2009) (Krekeler et al. 1997); 10, *P. tunisiensis* (Ben Ali Gam et al., 2009); 11, *P. mercurii* (Gilmour et al., 2019). Обозначения: +, рост есть; -, роста нет; w, слабый рост; ND – данные отсутствуют.

Характеристики	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Условия роста											
Температурный оптимум (°C)	24	25 – 30	30 – 35	30	25	35	30	35	35	37	32
Оптимум pH NaCl	8,5 – 9,5	7,5	6,5 – 7,0	7,3	7,0	6,5	6,0 – 7,4	5,5 – 8,5	ND	7	7,8
зависимость	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Доноры электронов											
Этанол	-	-	-	+	-	+	W	+	+	-	-
Фумарат	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+
Малат	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Акцепторы электронов											
Сера	+	+	-	-	-	ND	-	+	+	+	ND
Нитрат	-	-	W	-	+	ND	-	-	-	-	-
Фумарат	+	ND	W	-	+	-	-	-	+	-	+
Брожение											
Фумарат	-	ND	-	+	-	+	-	ND	ND	+	+
Лактат	+	ND	+	-	+	-	-	+	+	+	-
Пируват	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

Таблица 15 (продолжение)

Основные жирные кислоты	anteiso-C _{15:0} , C _{16:0} , C _{18:0} , and iso-C _{17:1ω8}	ND	iso-C _{15:0} , anteiso-C _{15:0} , summed feature 9 (iso-C _{17:1ω9c} and/or C _{16:0} 10-methyl), iso-C _{17:0}	C _{15:0} , C _{16:0} , C _{16:1} , C _{17:0} , C _{17:1} , C _{18:0} , C _{18:1}	C _{16:0} , C _{16:1} , C _{18:0} , C _{18:0} , iso-C _{15:0} , iso-C _{17:1ω9c}	iso-C _{15:0} , anteiso-C _{15:0} , C _{16:0} , iso-C _{17:0} , anteiso-C _{17:0} , iso-C _{17:1ω9c}	C _{18:0} , anteiso-C _{15:0} , C _{16:0} , C _{18:1ω7}	ND	ND	ND	iso-C _{15:0} , anteiso-C _{15:0} , iso-C _{17:0} , iso-C _{17:1ω9c} , anteiso-C _{17:0}
Содержание геномной ГЦ (мол%)	61,93	61,0	63,5	50,0	53,0	62,1	62,6	60,7	59,1*	59,6	65,2
Источник выделения	Наземный грязевой вулкан	Глубокие грунтовые воды	Глубоководные гидротермы	Глубоководные гидротермы	Морские отложения	Эстуарные отложения	Солоноватые лагунные отложения	Гиперсолёное озеро	Гиперсолёный цианобактериальный мат	Сточные воды	Эстуарные отложения

*Данные из базы данных GenBank

4.3 Выделение и описание новой алкалофильной галотолерантной нитратвосстанавливающей бактерии '*Sulfurospirillum tamanensis*' sp. nov.

Штамм T05b^T был выделен из образцов грязи активного грифона НГВ Гнилая гора (г. Темрюк, Краснодарский край, РФ) на лактате в качестве донора и нитрате в качестве акцептора электронов.

4.3.1. Морфология клеток штамма T05b^T

Клетки штамма T05b^T представляют собой спираиллы, 0,5 мкм толщиной и 1,5–2,5 мкм длиной, растущие одиночно или парами, и подвижны за счет одиночного полярного жгутика (Рис. 12). Образования эндоспор не наблюдалось на протяжении 30 суток культивирования.

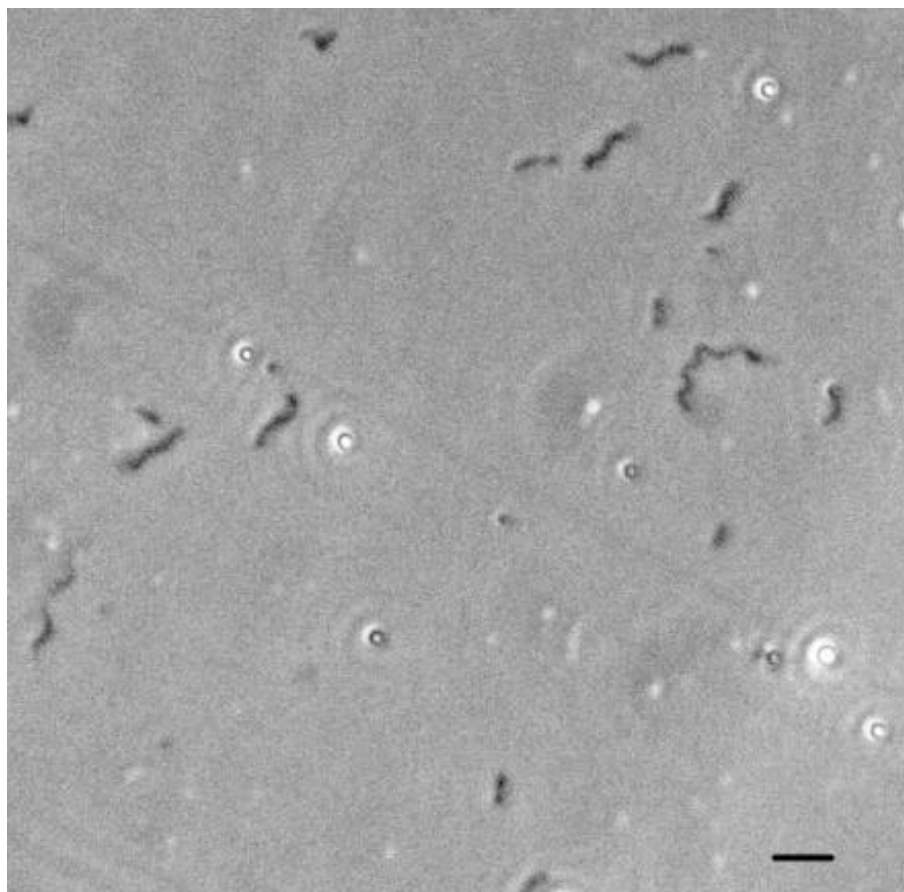


Рисунок 12. Морфология клеток *Sulfurospirillum tamanensis* T05b^T, длина масштабной линейки – 1,5 мкм.

4.3.2. Характеристики роста штамма T05b^T

Штамм T05b^T рос при температурах от 10 до 42°C, с оптимумом роста при 30°C. Рост не наблюдался при 50°C и выше и при 6°C и ниже, при инкубации в течение 20 дней. Диапазон pH для роста составлял 8,0 – 11,0 (оптимум 9,0) (Рис. 13), роста не отмечалось при pH 7,5 и ниже или 11,5 и выше. Штамм T05b^T рос при концентрации NaCl в среде от 0 до 14,0 % (вес/об.); 15% NaCl и выше роста не происходило. Время удвоения в оптимальных условиях составило 1,35 ч.

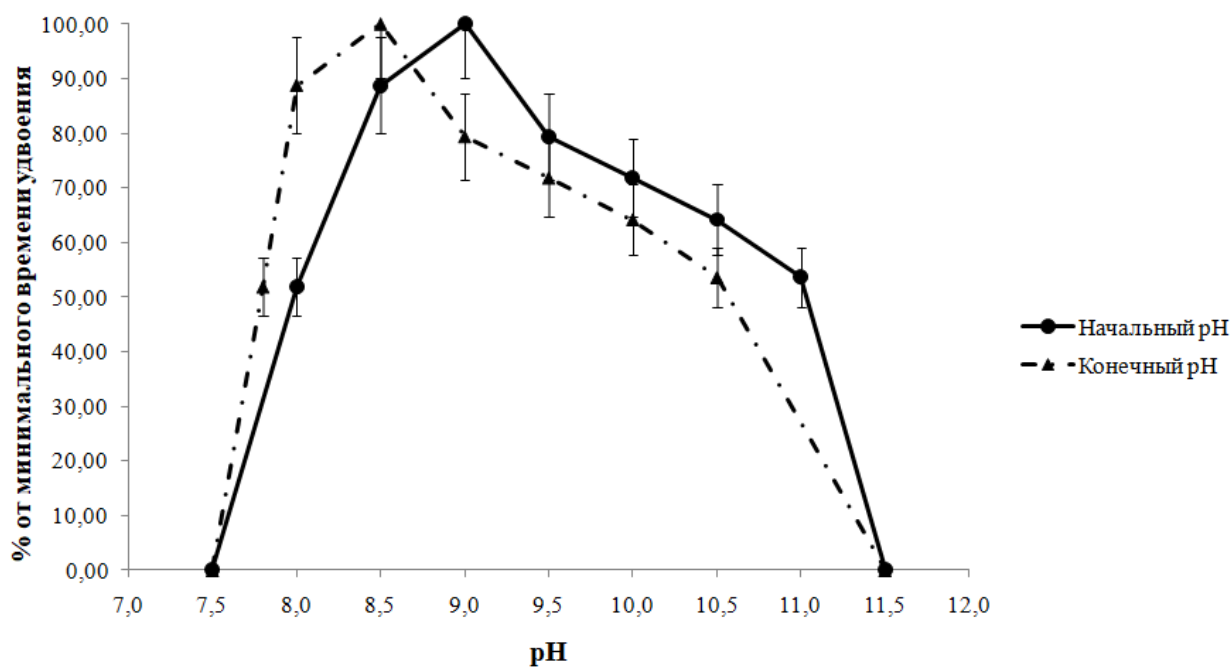


Рисунок 13. Влияние pH на скорость роста штамма T05b^T (при 30 °C).

4.3.3. Метаболизм штамма T05b^T

Штамм T05b^T рос, используя лактат (10 мМ) в качестве донора электронов и фумарат (10 мМ), элементную серу (5 г/л), сульфит (10 мМ), ДМСО (10 %) арсенат (10 мМ), нитрат (10 мМ) и кислород (3 % об./об. в газовой фазе) в качестве акцепторов электронов. Формиат (10 мМ)

использовался в качестве донора электронов вместе с фумаратом (10 мМ) и арсенатом (10 мМ) в качестве акцепторов электронов, однако рост с лактатом в качестве донора электронов был ощутимо лучше. Малат (10 мМ) использовался в качестве донора электронов с фумаратом (10 мМ), элементарной серой (5 г/л), арсенатом (10 мМ), нитратом (10 мМ) и кислородом (3% об./об. в газовой фазе). Пируват (10 мМ) использовался в качестве донора электронов с фумаратом (10 мМ), ДМСО (10 %), элементарной серой (5 г/л), тиосульфатом (10 мМ), арсенатом (10 мМ) и кислородом (3 % об./об. в газовой фазе). Водород использовался в качестве донора электронов только с фумаратом (10 мМ) и в отличие от *S. alkalitolerans* штамм T05b не нуждался в дополнительном источнике углерода для роста в этих условиях. Элементарная сера (5 г/л), тиосульфат и сульфит (10 мМ каждый) использовались в качестве доноров электронов с фумаратом (10 мМ). Элементарная сера (5 г/л), тиосульфат и сульфит (10 мМ каждый) использовались в качестве доноров электронов с нитратом (10 мМ) в присутствии малата или сукцината как источника углерода, причем рост с сульфитом значительно лучше, чем с элементарной серой или тиосульфатом. Ацетат в этих условиях не используется как источник углерода. Сульфид (в концентрациях до 5 мМ) использовался в качестве донора электронов для восстановления малата, фумарата (10 мМ каждый) и нитрата (1 мМ) без добавления дополнительных источников углерода с образованием элементарной серы, сукцината и ацетата (в соотношении 5:1 при росте с малатом и 6.7:1 при росте с фумаратом). Кислород использовался в качестве акцептора электронов с фумаратом, малатом, лактатом и пируватом (10 мМ каждый). Добавление дрожжевого экстракта (0,2 г/л) не стимулировало рост. Использование штаммом T05b^T различных доноров и акцепторов электронов приведено в Табл. 16.

Штамм T05b^T дисмутировал малат, пируват и фумарат. При дисмутации малата основными продуктами являлись сукцинат (4,6 мМ) и

ацетат (2,1 мМ). При дисмутации фумарата основными продуктами являлись сукцинат (5,95 мМ) и ацетат (1,3 мМ).

Сульфат (10 мМ) не использовался в качестве акцептора электронов. Штамм T05b^T не сбраживал глюкозу, фруктозу, сахарозу, лактат, формиат, малеинат (каждый субстрат 10 мМ), дрожжевой экстракт (1 г/л) и пептон (2.5 г/л). Штамм T05b^T не диспропорционировал элементарную серу, тиосульфат и сульфит.

Таблица 16. Использование доноров и акцепторов электронов штаммом T05b^T.

Акцептор / Донор	Лактат	Формиат	Малат	Пируват	Водород	Элементная сера	Сульфит	Тиосульфат	Сульфид
Нитрат	+	-	+	-	-	+	+	+	+
Фумарат	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Элементная сера	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Сульфит	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Тиосульфат	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ДМСО	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Арсенат	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Кислород	+	-	+	+	-	-	-	-	-

(+) – рост $> 2 \cdot 10^6$ кл/мл. (-) – отсутствие роста. Концентрация всех растворимых доноров и акцепторов – 10 мМ. Элементная сера – 5 г/л, ДМСО -10 %, кислород - 3% (об./об.) в газовой фазе, водород - 80% (об./об.) в газовой фазе. * в присутствии малата или сукцината как источника углерода

4.3.4. Состав жирных кислот и липидов мембран штамма T05b^T

Клеточные жирные кислоты штамма T05b^T были представлены смесью неразветвлённых насыщенных и ненасыщенных кислот: C16:1 ω 7 (45,9%), C16:0 (25,8%) и C18:1 ω 7 (20,9%). Также были обнаружены C14:1 ω 7 (3,1%), C14:0 (1,9%), C15:0 (0,3%), C16:1 ω 5 (0,7%) и C18:0 (1,4%).

4.3.5 Геносистематические характеристики штамма T05b^T

Геном штамма T05b^T, собранный из 63 контигов, имеет общую длину 2.456.696 п.о. и значение N50 73734 нт. Содержание Г+Ц геномной ДНК составляет 45.5%. Геном содержит 2568 нуклеотидных последовательностей кодирующих белки и 39 генов РНК. Большинство аннотированных генов отвечает за синтез аминокислот и производных (182), метаболизм белков (104), дыхание (93), кофакторы, витамины, простетические группы и образование пигментов (86) (Рис. 14).

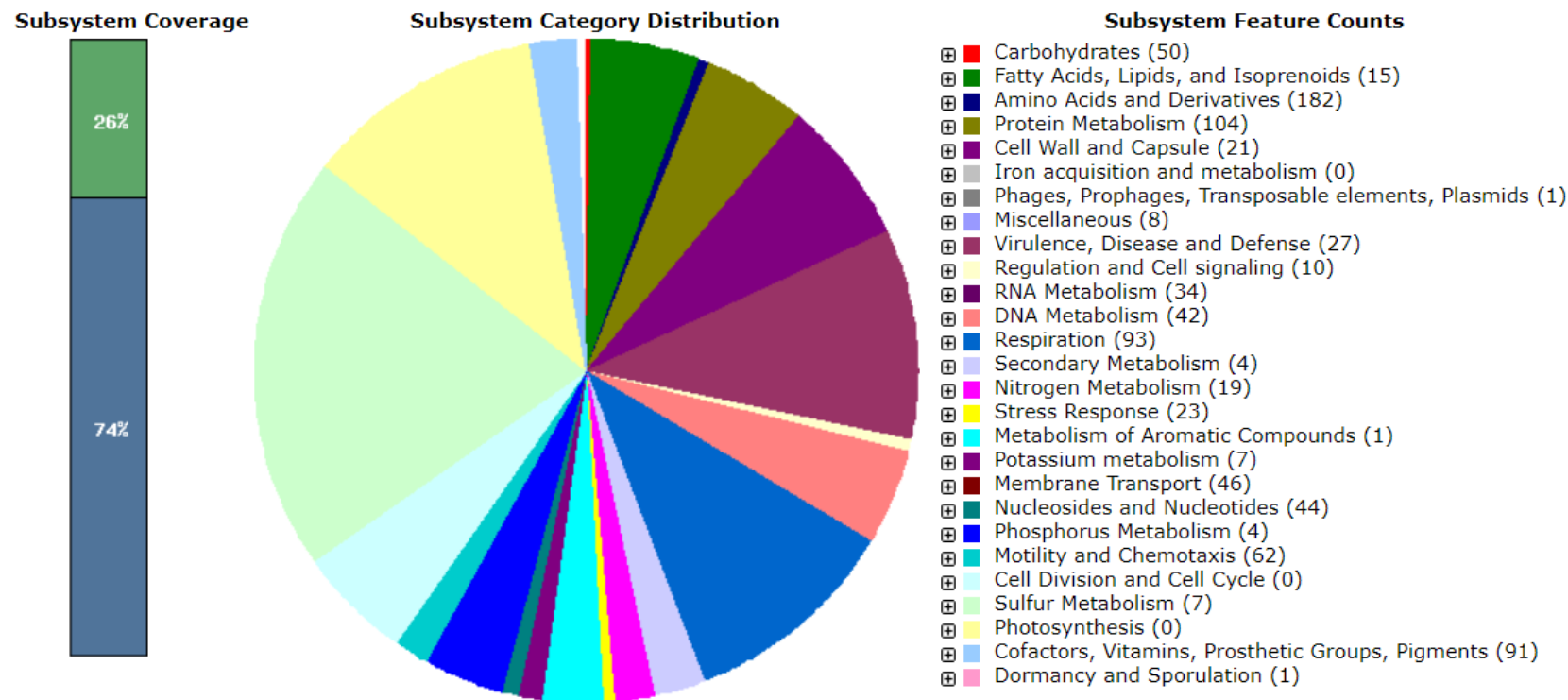


Рисунок 14. Распределение по категориям подсистем основных генов, кодирующих белок штамма T05b^T, аннотированных сервером аннотаций RAST. Гистограмма показывает охват подсистемы в процентах (зеленая полоса соответствует проценту белков, включенных в подсистему, а синяя полоса соответствует проценту белков, не включенных в подсистему). Круговая диаграмма показывает процентное распределение наиболее распространенных категорий подсистем.

4.3.5.1. Анализ генома штамма T05b^T

Углеродный метаболизм. В отличие от других представителей рода *Sulfurospirillum* (Ross et al., 2016), геном штамма T05b^T не содержит полного набора генов цикла трикарбоновых кислот. Однако, функцию отсутствующей малатдегидрогеназы может выполнять мембрансвязанная малат:хинон оксидоредуктаза (референсные гены здесь и далее в Табл. ПЗ), которая содержит ФАД в качестве кофактора и отдает электроны хинонам, которые впоследствии окисляются компонентами электронтранспортной цепи (Kather et al., 2000). Геном штамма T05b^T содержит гены фумаратгидратазы I типа, что является характерным для рода *Sulfurospirillum* (Ross et al., 2016). Гены пируваткарбоксилазы, присутствующие у всех представителей рода *Sulfurospirillum*, в геноме штамма T05b^T отсутствуют. Превращение пирувата в оксалоацетат происходит, по-видимому, с помощью оксалоацетатдекарбоксилазы. Наличие всех генов фосфатацетилтрансферазного/ацетаткиназного пути, вероятно, позволяет штамму T05b^T использовать лактат в качестве донора электронов, превращая ацетат в ацетил-КоА.

Геном штамма T05b^T содержит все гены неокислительной части пентозофосфатного пути, что является характерным для всех представителей рода *Sulfurospirillum* (Ross et al., 2016), а также все гены нефосфорилирующего пути Энтнера-Дудорова.

Сопряжение окисления органических субстратов с цепью переноса электронов происходит через респираторный комплекс I. Геном штамма T05b^T кодирует два типа НАДН: хиноноксидоредуктазоподобных комплексов: комплекс ϵ -протеобактериального типа, который может связывать окисление пирувата с цепью переноса электронов, используя ферредоксин / флаводоксин в качестве переносчика электронов и комплекс с высокой степенью схожести с *nuoEF* *E. coli*, который может связывать множественные дегидрогеназы с цепью переноса электронов (Goris et al.,

2014). Наличие комплекса ϵ -протеобактерального типа (ϵ -NADH I) характерно для всех представителей рода *Sulfurospirillum* (Ross et al., 2016).

Азотный метаболизм. Геном штамма T05b^T содержит генный кластер кодирующий дыхательный периплазматический комплекс нитратредуктазы Nar типа – *narAGHBFLD*, характерный для *Epsilonproteobacteria* (Simon et al., 2003) и расположенный рядом с ним генный кластер нитритредуктазы *nrfHAIJ*. Гены редуктаз, восстанавливающих оксид азота и закись азота (*nor* и *nos*) в геноме штамма T05b^T отсутствуют. Наиболее вероятно, что штамм T05b^T осуществляет диссимиляционное восстановление нитрата с образованием аммония за счёт канонических энзиматических систем Nar и Nrf типа.

В геноме штамма T05b^T закодированы все компоненты нитрогеназного комплекса для фиксации молекулярного азота *nifHDKE*.

Серный метаболизм. Геном штамма T05b^T не содержит генов диссимиляционной сульфитредуктазы Dsr типа и окисляющих серные соединения белков Sox. Возможно, окисление элементной серы и тиосульфата, происходит с участием серии ферментов, включающих роданазу и Hdr-подобный комплекс (Zhang et al., 2021); биохимия и генетические детерминанты этих метаболических путей в настоящее время изучены недостаточно. В щелочных условиях вероятно также окисление S⁰ связанное с образованием растворимых полисульфидов (Ghosh, Dam, 2009). Способность изолята восстанавливать тиосульфат и элементную серу, вероятно, вызвана активностью тиосульфат/полисульфид редуктазы Phs/Psr, три субъединицы которой (PhsABC) закодированы в генном кластере. Окисление сульфида, возможно, осуществляется сульфид:хинон оксидоредуктазой Sqr.

Метаболизм мышьяка. Геном штамма T05b^T кодирует две энзиматические системы, восстанавливающие арсенат: Arr - для анаэробного

дыхания с As(V) в качестве конечного акцептора электронов и Ars, обуславливающую устойчивость к ионам мышьяка. Субъединицы арсенатредуктазы ArrA и ArrB имеют 50% и 52% идентичности аминокислотных последовательностей с субъединицами хорошо изученной дыхательной арсенатредуктазы из *Shewanella* ANA-3 (Malasarn, Keeffe, Newman, 2008). Система детоксикации мышьяка представлена опероном, состоящим из двух копий тиоредоксин-связанной арсенатредуктазы ArsC, белками устойчивости к мышьяку и арсенит/антимонит H⁺ антипортером ArsB.

Гидрогеназы. Геном штамма T05b^T содержит один генный кластер, кодирующий две разные NiFe гидрогеназы. Согласно классификатору гидрогеназ HydDB (Søndergaard, Pedersen, Greening, 2016) каталитическая единица одной из них принадлежит к (NiFe) Group 1b, которая включает дыхательные водород-поглощающие гидрогеназы, участвующие в процессах анаэробного дыхания с фумаратом, нитратом и сульфатом и широко представленную среди *Epsilonproteobacteria*. Малая и цитохром *b* содержащие субъединицы этой гидрогеназы обеспечивают перенос электронов к пулу хинонов. Большая субъединица второй гидрогеназы HyuB относится к (NiFe) Group 2d, которая включает дыхательные водород-поглощающие гидрогеназы, участвующие в аэробном и фумаратном дыхании. Этот тип гидрогеназ встречается у бактерий различных филогенетических групп, однако у представителей *Epsilonproteobacteria* её функции не охарактеризованы. Малая субъединица этой гидрогеназы HyuA также закодирована в геноме. Кроме этого, кластер содержит гены белков участвующих в сборке гидрогеназ *hyuAEDCB*.

4.3.5.2. Филогенетическое положение штамма T05b^T

Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК штамма T05b^T, полученные путем амплификации с универсальными бактериальными

праймерами и в ходе полногеномного секвенирования были идентичны. Сравнение 1473 нуклеотидов последовательности гена 16S рРНК штамма T05b с нуклеотидными последовательностями, размещенными в базе данных GenBank (Benson et al., 2000) показали, что изолят принадлежит к роду *Sulfurospirillum* класса *Epsilonproteobacteria* с 98,61 % сходства с геном 16S рРНК с *S. alkalitolerans* (Sorokin, Tourova, Muzyer, 2013). Реконструкция филогенетического дерева гена 16S рРНК показала, что штамм T05b представляет собой монофилетическую ветвь, четко отделенную от наиболее близких видов (Рис. 15).

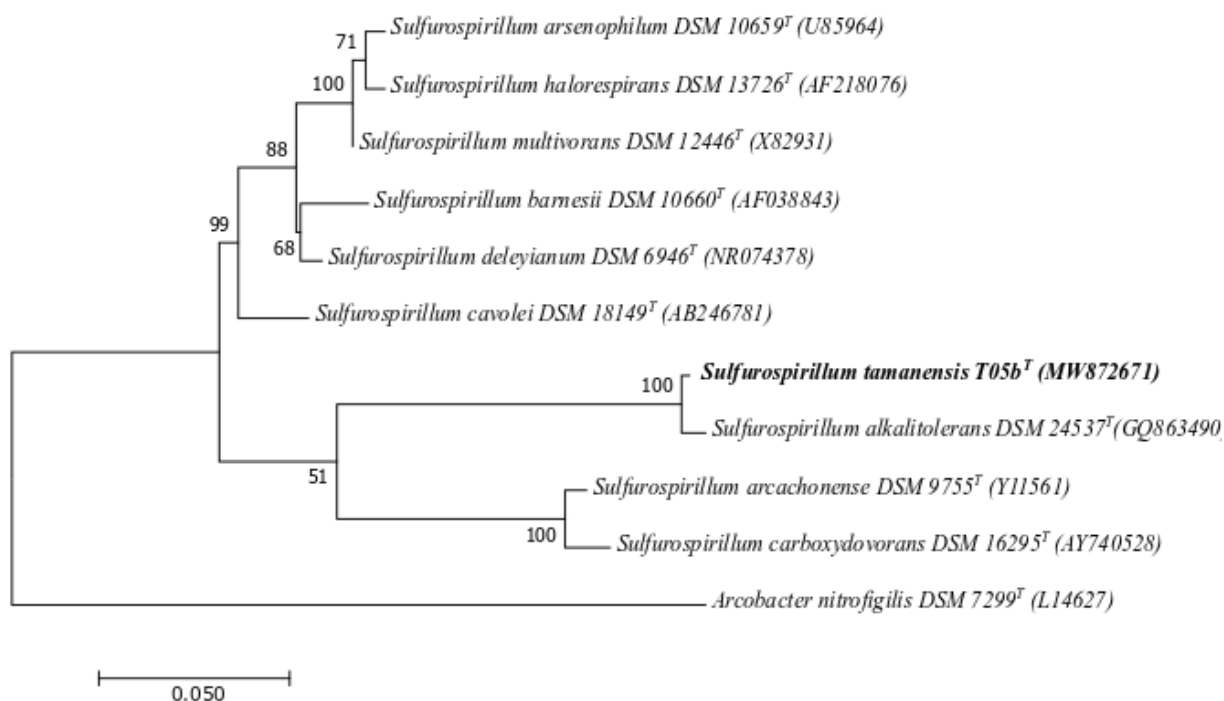


Рисунок 15. Филогенетическое дерево, основанное на последовательности гена 16S рРНК, показывающее филогенетическое положение *Sulfurospirillum tamanensis* T05b^T, масштабная линейка 5% различия последовательностей.

Согласно современным рекомендациям по систематике прокариот необходимо сравнение идентичности нуклеотидных последовательностей (ANI) и уровня ДНК-ДНК гибридизации *in silico* с ближайшим родственником новому изоляту микроорганизмом. Однако определить попарное значение ANI и значение ДНК-ДНК гибридизации *in silico* генома штамма T05b и генома ближайшего родственника *S. alkalitolerans* (DSM 24537^T) не

представилось возможным ввиду отсутствия генома *S. alkalitolerans* в общедоступных базах данных. Вместе с этим, полноценным основанием для определения изолята к новому виду считается уровень сходства по генам 16S рРНК ниже 98,7 % (Chun et al., 2018).

4.3.6. Сравнение ключевых характеристик штамма T05b^T с другими представителями рода *Sulfurospirillum*

Штамм T05b^T обособлен от других представителей рода *Sulfurospirillum* на филогенетическом дереве. Представители рода *Sulfurospirillum* были выделены из различных местообитаний, однако штамм T05b^T является первым представителем рода, выделенным из наземного грязевого вулкана. Дифференцирующие характеристики штамма T05b^T и членов рода *Sulfurospirillum* представлены в Табл. 17. Наиболее заметными отличиями являются более высокий рН оптимум и более высокий диапазон солёности для роста.

Основываясь на фенотипических свойствах и результатах филогенетического и геномного анализов, штамм T05b^T, выделенный из наземного грязевого вулкана, был описан как новый вид, которому было дано название *Sulfurospirillum tamanensis* (Фролова и др., 2023а).

Описание *Sulfurospirillum tamanensis* sp. nov.

Sulfurospirillum tamanensis (ta.ma.ne`n.sis – лат. прил., обитающий на Тамани)

Клетки представляют собой подвижные спирали, 0,5 мкм толщиной и 1,5–2,5 мкм длиной. Рост при температуре 6 – 42 °С (оптимум - 30 °С), рН 8,0 – 11,0 (оптимум – 9,0), концентрации NaCl 0 – 14 % (вес/об.) использует лактат, формиат, малат, пируват, молекулярный водород, элементную серу, сульфит, тиосульфат и сульфид в качестве донора электронов и нитрат, фумарат, элементную серу, сульфит, тиосульфат, ДМСО, арсенат и кислород в качестве акцептора электронов. Продуктом восстановления нитрата

является аммоний. Сбраживает малат, пируват, фумарат. Способен к микроаэробному (до 3 % O₂ об/об) росту. Не использует сульфат и Fe(III) в качестве акцептора электронов. Не сбраживает глюкозу, фруктозу, сахарозу, лактат, формиат, малеинат, дрожжевой экстракт и пептон. Не диспропорционирует элементарную серу, тиосульфат и сульфит. Размер генома – 2.456.696 п.о. Содержание Г+Ц в геномной ДНК 45,5% (полногеномное секвенирование).

Идентификационный номер последовательности 16S рРНК в GenBank/EMBL - MW872671, полногеномная последовательность депонирована в DDBJ/ENA/GenBank под номером JAFHKK010000000.

Типовой и единственный штамм T05b^T депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) под номером DSM 112596^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером =VKM В- В-3538^T.

Таблица 17. Дифференцирующие характеристики штамма T05b^T и представителей рода *Sulfurospirillum*. 1. T05b^T (Фролова и др., 2023а); 2. *S. alkalitolerans* (Sorokin, Tourova, Muyzer, 2013); 3. *S. arsenophilum* (Stolz et al., 1999); 4. *S. arcachonense* (Finster, Liesack, Tindall, 1997); 5. *S. barnesii* (Stolz et al., 1999); 6. *S. cavolei* (Kodama, Na, Watanabe, 2007); 7. *S. deleyianum* (Schumacher et al., 1992); 8. *S. halorespirans* (Luijten et al., 2003); 9. *S. multivorans* (Luijten et al., 2003). Все штаммы используют водород, пируват, формиат, фумарат в качестве донора электронов и элементную серу, фумарат в качестве акцептора электронов. Ни один из штаммов не использует сульфат как акцептор электронов. Обозначения: +, микробный рост; -, микробный рост отсутствует; Н.д. – данные в литературных источниках отсутствуют.

Характеристика	1	2	3	4	5	6	7	8	9
T опт, °C	30	Н.д. - 41 (Н.д.)	Н.д. – 30 (20)	8 – 30 (26)	Н.д. – 30 (Н.д.)	20 – 40 (30)	20 – 36 (Н.д.)	Н.д. (25 – 30)	Н.д. (30)
pНопт	9,0	8,5	7,0 – 7,4	7,5	7,5	7,0	7,1	Н.д.	7 – 7,5
NaCl, % (вес/объем)	0 - 14	3,5 – 10,2	0,1	0,6 - 4	0 – 0,8	< 1,0	< 0,2	Н.д.	Н.д.
Доноры электронов									
Сульфид	+	+	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	+	Н.д.	+
Лактат	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Малат	+	-	Н.д.	+	Н.д.	+	+	Н.д.	Н.д.
Акцепторы электронов									
Тиосульфат	+	+	+	-	+	+	+	-	+
Сульфит	+	-	Н.д.	-	-	+	+	-	Н.д.
ДМСО	+	-	Н.д.	-	-	+	+	Н.д.	+
Нитрат	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Арсенат	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Кислород 3% (вес/объем)	+	-	-	+	+	+	+	+	Н.д.
Брожение									
Лактат	-	-	-	Н.д.	Н.д.	-	Н.д.	Н.д.	Н.д.
Малат	+	-	Н.д.	-	Н.д.	+	+	Н.д.	Н.д.
Пируват	+	+	-	Н.д.	Н.д.	+	Н.д.	+	+
Фумарат	+	+	+	+	+	+	+	+	Н.д.
Содержание Г+Ц (%)	45,5	47,6	40,9	32	40,8	42,7	38,4	41,8	41,5

Таблица 17 (продолжение)

Источник выделения	Грязевой вулкан	Биореактор	Пресноводные отложения, загрязненный мышьяком	Морской осадок	Пресноводное болото, загрязненное селенатом	Подземные воды, загрязненные нефтью	Осадок лесного пруда	Анаэробная почва, загрязненная хлорированными и алифатическими соединениями	Активный ил
---------------------------	-----------------	------------	-----------------------------------------------	----------------	---------------------------------------------	-------------------------------------	----------------------	-----------------------------------------------------------------------------	-------------

4.4 Выделение и описание новой алкалофильной сульфатовосстанавливающей бактерии '*Desulfobotulus pelophilus*' sp. nov.

Штамм Н1^Т был выделен из образцов грязи активного грифона НГВ Гнилая гора (г. Темрюк, Краснодарский край, РФ) на пирувате в качестве субстрата для роста.

4.4.1 Морфология клеток штамма Н1^Т

Клетки штамма Н1^Т представляют собой вибрионы, 1 мкм толщиной и 2,0–2,5 мкм длиной, растущие одиночно, и подвижные за счет одиночного полярного жгутика (Рис. 16). Образования эндоспор не наблюдалось на протяжении 30 сут культивирования.

4.4.2 Характеристика роста штамма Н1^Т

Штамм Н1^Т способен расти при температурах от 14 до 42°C, с оптимумом при 37°C. Рост не наблюдался при 50°C и выше и при 10°C и ниже, при инкубации в течение 20 дней. Диапазон рН для роста составляет 8,5 – 10,5 (оптимум 9,5) (Рис. 16), роста не отмечалось при рН 8,0 и ниже или 11,0 и выше. Штамм Н1^Т способен расти при концентрации NaCl в среде от 0,5 до 6,0 % (вес/об.); при 7% NaCl и выше роста не происходило. Время удвоения в оптимальных условиях составило 2,3 ч.

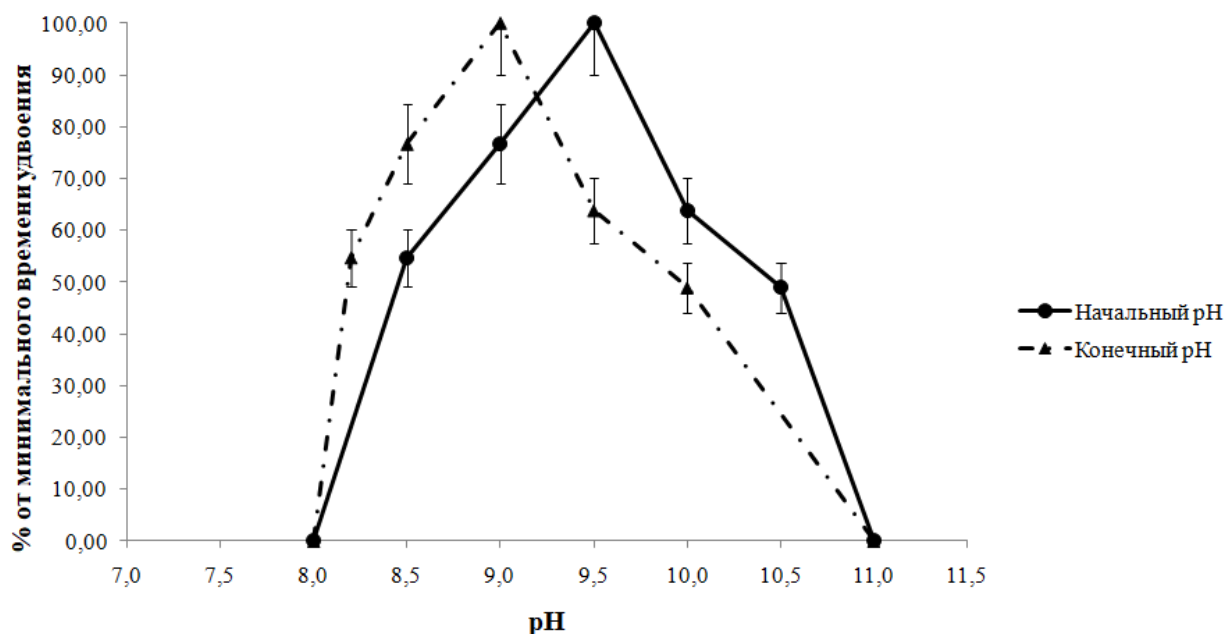


Рисунок 16. Влияние pH на скорость роста штамма H1^T (при 37 °C).

4.4.3 Метаболизм штамма H1^T

Штамм H1^T способен использовать органические кислоты в качестве доноров и соединения серы в качестве акцепторов электронов для роста. Добавление дрожжевого экстракта (0,2 г/л) незначительно стимулировало рост, однако не являлось необходимым. Максимальная концентрация клеток (около $5 \cdot 10^7$ кл/мл) наблюдалась как при росте с пируватом и сульфатом, так и при культивировании с пируватом в отсутствие акцептора. Пируват, лактат (10 мМ), бутират (10 мМ), капроат (5 мМ), каприлат (1 мМ) и пеларгонат (1 мМ) использовались штаммом H1^T в качестве доноров электронов в присутствии сульфата в качестве акцептора электронов. Продуктами реакции в этом случае являлись сульфид и ацетат. Следующие соединения не использовались в качестве доноров электронов (10 мМ, если не указана иная концентрация) с сульфатом в качестве акцептора: ацетат, формиат, формиат в присутствии ацетата (2 мМ) в качестве источника углерода, пропионат, сукцинат, фумарат, малат, метанол, этанол, бутанол, изобутанол, глицерин, рибоза, глюкоза, фруктоза, трибутират, валерат, пальмитат (1 мМ), стеарат (1 мМ), олеат (1 мМ), триолеат (1 мМ), дрожжевой экстракт (2 г/л),

молекулярный водород ($H_2:CO_2$, 80:20% в газовой фазе). Элементарная сера (5 г/л), сульфит (10 мМ) и сульфат (14 мМ) использовались штаммом $H1^T$ в качестве акцепторов электронов в присутствии бутирата в качестве донора электронов. Тиосульфат, диметилсульфоксид (ДМСО), фумарат, нитрат, нитрит, арсенат, селенит (все в концентрации 10 мМ) и ферригидрит (слабокристаллический оксид $Fe(III)$, 90 мМ) не использовались штаммом $H1^T$ в качестве акцепторов электронов в присутствии бутирата как донора электронов. Штамм $H1^T$ не способен к росту в аэробных и микроаэробных (до 3% кислорода) условиях.

Пируват и лактат (10 мМ каждый) сбраживались штаммом $H1^T$ с образованием ацетата и водорода в качестве конечных продуктов. Штамм $H1^T$ не сбраживал формиат, фумарат, цитрат, сукцинат, фруктозу, сахарозу, трегалозу, галактозу, ксилозу, пептон и дрожжевой экстракт в течение 3-х недель инкубации. Штамм $H1^T$ не способен к диспропорционированию элементарной серы, тиосульфата и сульфита как в присутствии ферригидрита, служащего химической ловушкой для сульфида, так и в его отсутствии при культивировании в бутылки с большой газовой фазой.

4.4.4 Состав жирных кислот мембран штамма $H1^T$

Клеточные жирные кислоты штамма $H1^T$ были представлены смесью неразветвлённых насыщенных и ненасыщенных кислот: $C20:0$ (54,2%), $C22:0$ (24,6%) и $C18:0$ (11,1%). Также были обнаружены $C16:0$ (3,8%), $C24:0$ (2,4%), $C18:1 \omega 7c$ (2,2%) и $C18:1 \omega 9c$ (1,8%).

4.4.5 Геносистематические характеристики штамма $H1^T$

Геном штамма $H1^T$, собранный из 86 контигов, имеет общую длину 3.656.775 п.о. и значение $N50$ 160366 нт. Содержание Г+Ц геномной ДНК составляет 51.1%. Геном содержит 3783 нуклеотидных последовательностей кодирующих белки и 55 генов РНК. Большинство аннотированных генов отвечает за синтез аминокислот и производных (151), метаболизм белков (147), метаболизм углеводов (101), дыхание (83), кофакторы, витамины, простетические группы и образование пигментов (55) (Рис. 17).

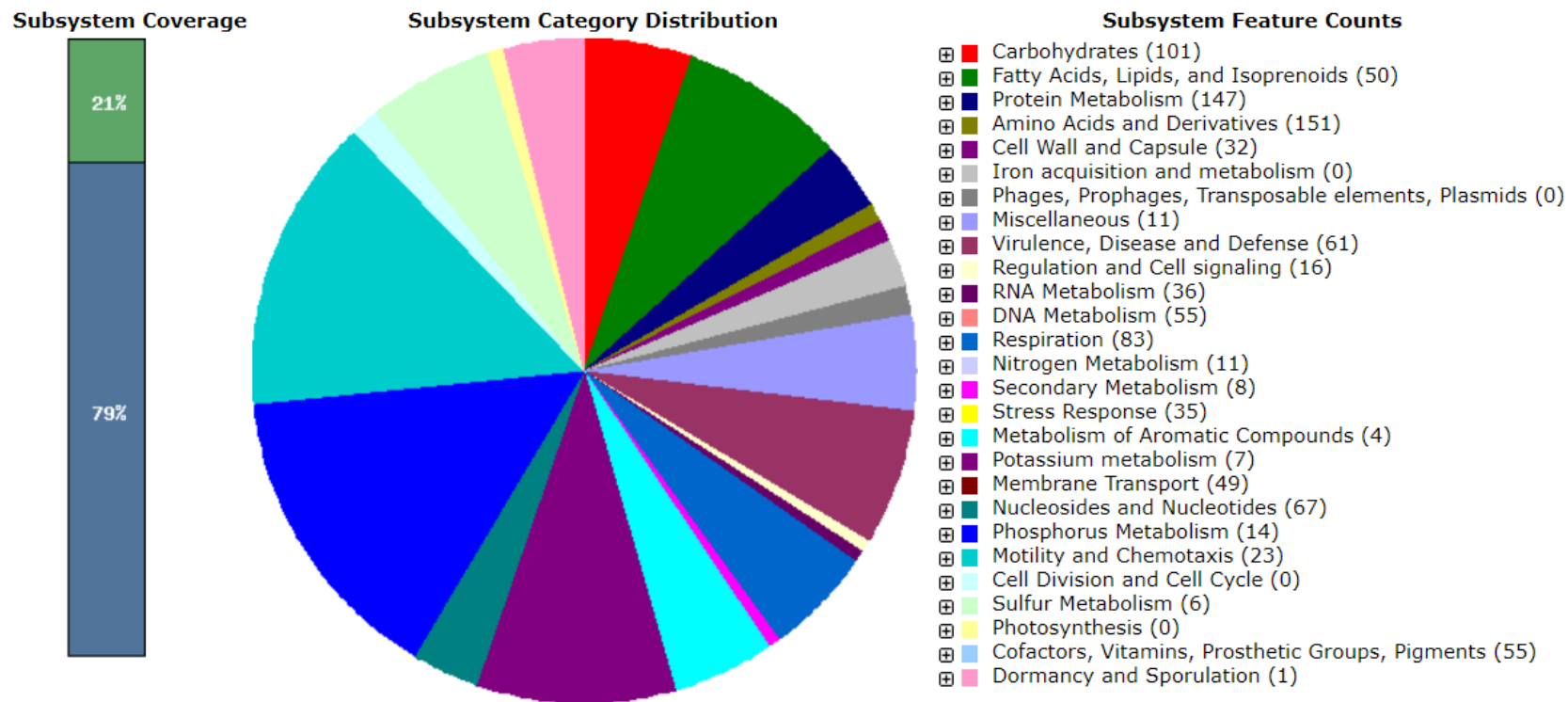


Рисунок 17. Распределение по категориям подсистем основных генов, кодирующих белок штамма H1^T, аннотированных сервером аннотаций RAST. Гистограмма показывает охват подсистемы в процентах (зеленая полоса соответствует проценту белков, включенных в подсистему, а синяя полоса соответствует проценту белков, не включенных в подсистему). Круговая диаграмма показывает процентное распределение наиболее распространенных категорий подсистем.

4.4.5.1 Анализ генома штамма H1^T

Геном штамма H1^T содержит гены пути Эмбдена-Мейерхофа-Парнаса, включая NAD-зависимую глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (референсные гены здесь и далее в Табл. П4), триозофосфат изомеразу, глюкозо-6-фосфат изомеразу, фосфоглицерат киназу, енолазу, пируват киназу, 6-фосфофруктокиназу, фруктозо-бифосфатальдолазу и фосфоглицерат мутазу. Однако, ген, кодирующий гексокиназу, катализирующую фосфорилирование глюкозы на самой первой стадии гликолиза, отсутствует. Цикл трикарбоновых кислот в геноме штамма H1^T закодирован не полностью, отсутствуют гены малат дегидрогеназы, сукцинат дегидрогеназы и сукцинил-КоА синтетазы.

Геном штамма H1^T содержит полный набор генов, необходимых для осуществления процесса диссимиляционной сульфатредукции (Pereira et al., 2011), включая сульфат аденилилтрансферазу Sat, неорганическую пирофосфатазу, AprA и AprB субъединицы APS редуктазы, компоненты диссимиляторной сульфит редуктазы DsrABCD и электрон-переносящие комплексы DsrMKJOP и QmoABC. В геноме штамма H1^T были найдены два гена, кодирующие молибдоптериновую оксидоредуктазу, которые, согласно нашему филогенетическому анализу, вероятнее всего являются нитрат редуктазами, а не каталитической субъединицей полисульфидредуктазы PsrA. Кроме того, характерное для полисульфидредуктазы генное окружение, для данных молибдоптериновых оксидоредуктаз в геноме штамма H1^T отсутствует. Таким образом, в восстановлении серы не участвует полисульфидредуктаза PsrABC. Геном штамма H1^T кодирует ферменты роданазу и hdr-подобный комплекс с субъединицами *hdrA*, *hdrB* и *hdrC*, которые, возможно, детерминируют окисление элементной серы, однако их биохимический механизм в настоящее время не является достаточно изученным (Zhang et al., 2021).

В геноме штамма Н1^Т содержатся все гены, необходимые для β-окисления жирных кислот, включая ацил-СоА дегидрогеназу, эноил-СоА гидратазу, 3-гидроксиацил-СоА дегидрогеназу и 3-кетоацил-СоА тиолазу.

В геноме штамма Н1^Т закодированы все компоненты нитрогеназного комплекса для фиксации молекулярного азота, включая Мо-Fe- и Fe-белки нитрогеназы *nifHDK*, а также белки, необходимые для её сборки и регуляции: *nifENB*, *nifU*, *nifS*, *NifA* и *NtrXY*.

Геном штамма Н1^Т содержит гены каталазы, супероксид дисмутазы, хинол оксидазы *CydAB*, а также несколько копий генов белков, участвующих в защите от окислительного стресса, таких как рубредоксин *Rbo* и рубреритрин *Rbr*, которые, предположительно, выполняют эту функцию у *Desulfovibrio vulgaris* (Lumppio et al., 2001).

4.4.5.2 Филогенетическое положение штамма Н1^Т

Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК штамма Н1^Т, полученные путем амплификации с универсальными бактериальными праймерами и в ходе полногеномного секвенирования были идентичны. Сравнение 1539 нуклеотидов последовательности гена 16S рРНК штамма Н1^Т с нуклеотидными последовательностями, размещенными в базе данных GenBank (Benson et al., 2000) показали, что изолят принадлежит к роду *Desulfobotulus* класса *Deltaproteobacteria* с 98,31 % сходства с геном 16S рРНК с *Desulfobotulus mexicanus* (Pérez-Bernal et al., 2020). Реконструкция филогенетического дерева гена 16S рРНК показала, что штамм Н1^Т представляет собой монофилетическую ветвь, четко отделенную от наиболее близких видов (Рис. 18).

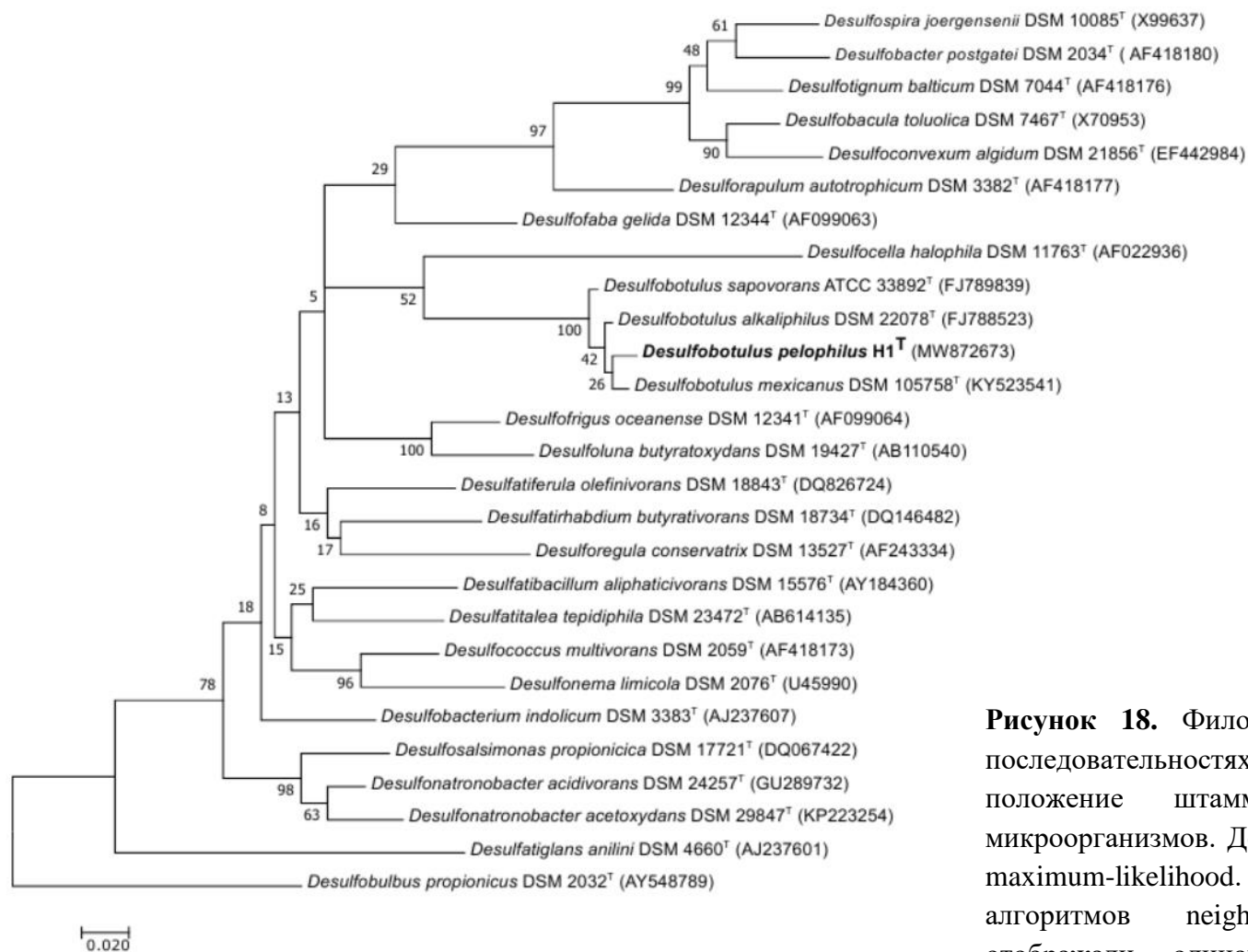


Рисунок 18. Филогенетическое дерево, основанное на последовательностях гена 16S рРНК, показывающее положение штамма Н1Т и родственных ему микроорганизмов. Дерево было реконструировано методом maximum-likelihood. Деревья, построенные с помощью алгоритмов neighbor-joining и minimum-evolution, отображали одинаковую топологию. Каждое число указывает значение начальной загрузки из 1000 повторностей. Бар, 0,020 замен на нуклеотидное положение. Идентификационные номера GenBank указаны в скобках.

Попарное сравнение средней нуклеотидной идентичности (ANI) генома штамма H1^T и ближайшего родственного ему микроорганизма, *D. mexicanus* (DSM 105758^T) составляло 88,7%. Значение *in silico* ДНК-ДНК гибридизации H1^T и *D. mexicanus* (DSM 105758^T) по рекомендованной формуле 2 составляло 26,10%. Оба этих значения существенно ниже предлагаемого для прокариот порогового значения для разграничения на уровне видов.

3.4.6 Сравнение ключевых характеристик штамма H1^T с другими представителями рода *Desulfobotulus*

Представители рода *Desulfobotulus* широко географически распространены и были обнаружены в разнообразных экосистемах, включая пресноводные местообитания и щелочные содовые или кратерные озера (GBIF (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei>). Штамм H1^T является первым представителем этого рода, выделенным из наземного грязевого вулкана. Новый изолят имеет диапазоны pH, температуры и солености для роста, близкие к параметрам в его среде обитания.

Метаболический потенциал, кодируемый в геноме штамма H1^T, соответствует фенотипическим данным. Для всех видов рода *Desulfobotulus* характерно использование алифатических жирных кислот в процессе диссимиляционной сульфатредукции. Дифференцирующие характеристики штамма H1^T и членов рода *Desulfobotulus* представлены в Табл. 18. Наиболее заметными отличиями являются более высокий температурный оптимум и способность сбраживать лактат. Таким образом, на основании проведенных исследований мы предлагаем отнести штамм H1^T к новому виду рода *Desulfobotulus* - *Desulfobotulus pelophilus* sp. nov (Фролова и др., 2023b).

Описание *Desulfobotulus pelophilus* sp. nov.

Desulfobotulus pelophilus (pe.lo'phi.lus. Гр. муж. сущ. *pêlos*, грязь, Н.лат. прил. *philus -a -um*, любящий; от Гр. прил. *philos -ê -on*, любящий; Н.лат. муж. прил. *pelophilus*, любящий грязь, так как этот вид был выделен из грязевого вулкана).

Клетки представляют собой подвижные вибрионы, 1 мкм толщиной и 2,0 – 2,5 мкм длиной. Рост при температуре 14 – 42 °С (оптимум – 37 °С), pH 8,5 – 10,5 (оптимум – 9,5) (Рис. 13), концентрации NaCl 0,5 – 6 % (вес/об.). Использует пируват, лактат, бутират, капроат, каприлат и пеларгонат в качестве донора электронов и элементную серу, сульфит и сульфат в качестве акцептора электронов. Сбраживает пируват и лактат. Не способен к росту в присутствии кислорода. Не использует тиосульфат, ДМСО, фумарат, нитрат, нитрит, арсенат, селенит и Fe(III) в качестве акцептора электронов. Не диспропорционирует элементную серу, тиосульфат и сульфит. Не сбраживает глюкозу, фруктозу, сахарозу, трегалозу, галактозу, ксилозу, фумарат, цитрат, дрожжевой экстракт и пептон. В жирнокислотном составе клеток преобладают C20:0, C22:0 и C18:0. Размер генома – 3.656.775 п.о. Содержание Г+Ц в геномной ДНК 51.1% (полногеномое секвенирование).

Идентификационный номер последовательности 16S рРНК в GenBank/EMBL - MW872673, полногеномная последовательность депонирована в DDBJ/ENA/GenBank под номером JAPFPW010000000.

Типовой и единственный штамм H1^T депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) под номером DSM 112796^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером =VKM В- В-3697^T.

Таблица 18. Дифференцирующие характеристики штамма H1^T и других видов рода *Desulfobotulus*. 1. H1^T ((Фролова и др., 2023b)); 2. *D. mexicanus* (Pérez-Bernal et al., 2020); 3. *D. alkaliphilus* (Sorokin, Detkova, Muzyer, 2010); 4. *D. sapovorans* (Kuever et al., 2005). Все штаммы используют пируват в качестве донора электронов и сульфат и сульфит в качестве акцептора электронов. Н.д. – данные в литературных источниках отсутствуют.

Характеристика	1	2	3	4
Т опт, °С	37	32	32	34
рН опт	9,5	9,0 – 9,6	9,9 – 10,1	7,7
NaCl, % (вес/объем)	0,5 - 6	0,4 – 6,75	Н.д.	<1,875
Доноры электронов				
Жирные кислоты	C4, C6, C8, C9	C4, C6, C8, C10, C14, C16, C18	C4, C6, C8, C9	C4 – C16(18)
2-метилбутират	-	+	-	+
лактат	+	-	-	+
Акцепторы электронов				
Тиосульфат	+	-	+	-
Элементная сера	+	+	+	-
Брожение				
Лактат	+	Н.д.	Н.д.	-
Пируват	+	-	+	+
Содержание Г+Ц (%)	51,1	49,0	51,3	53
Источник выделения	Наземный грязевой вулкан	Содовое озеро	Содовое озеро	Пресный водоем

4.5 Выделение и описание новой алкалофильной анаэробной бактерии, сбразживающей углеродные соединения '*Petrocella pelovolcani*' sp. nov.

Штамм FN5suc^T был выделен из образцов грязи активного грифона НГВ Гнилая гора (г. Темрюк, Краснодарский край, РФ) на сахарозе в качестве субстрата для роста.

4.5.1 Морфология клеток штамма FN5suc^T

Клетки штамма FN5suc^T представляют собой подвижные палочки с закругленными концами, 0,3 – 0,4 мкм толщиной и 1,5–2,5 мкм длиной, растущие одиночно или образуя длинные цепи (до 5-6 клеток) в позднеэкспоненциальной фазе (Рис. 19). Образование эндоспор не наблюдалось на протяжении 30 суток культивирования. Клетки окрашивались по Граму положительно как в экспоненциальной, так и стационарной фазах роста.

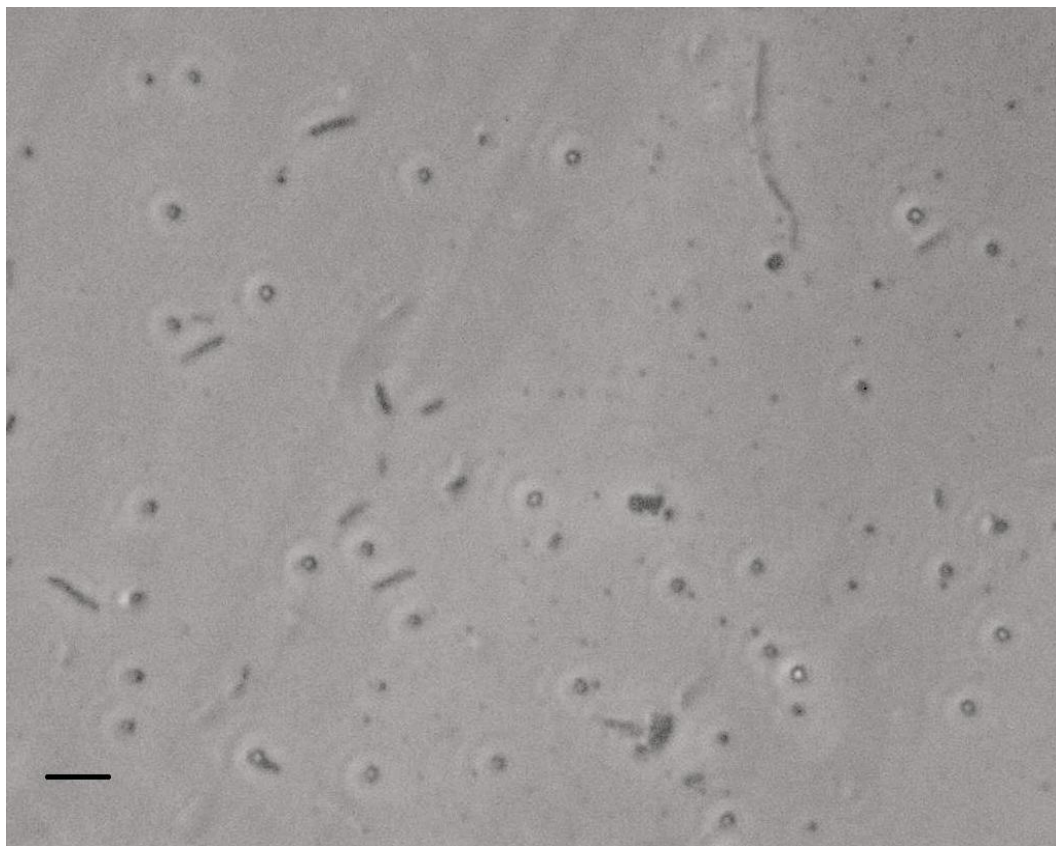


Рисунок 19. Морфология клеток *Petrocella pelovolcani* Fn5suc^T, длина масштабной линейки – 1,5 мкм.

4.5.2 Характеристика роста штамма FN5suc^T

Штамм FN5suc^T способен расти при температурах от 10 до 37°C, с оптимумом при 30°C. Рост не наблюдался при 42°C и выше и при 6°C и ниже, при инкубации в течение 20 дней. Диапазон pH для роста составляет 7,5 – 10,0 (оптимум 9,0) (Рис. 20), роста не отмечалось при pH 7,0 и ниже или 10,5 и выше. Штамм FN5suc^T способен расти при концентрации NaCl в среде от 0,001 до 5,0 % (вес/об.); при 6% NaCl и выше роста не происходило. Время удвоения в оптимальных условиях составляет 1,85 ч. Добавление дрожжевого экстракта (50 мг/л) являлось необходимым для роста штамма FN5suc^T.

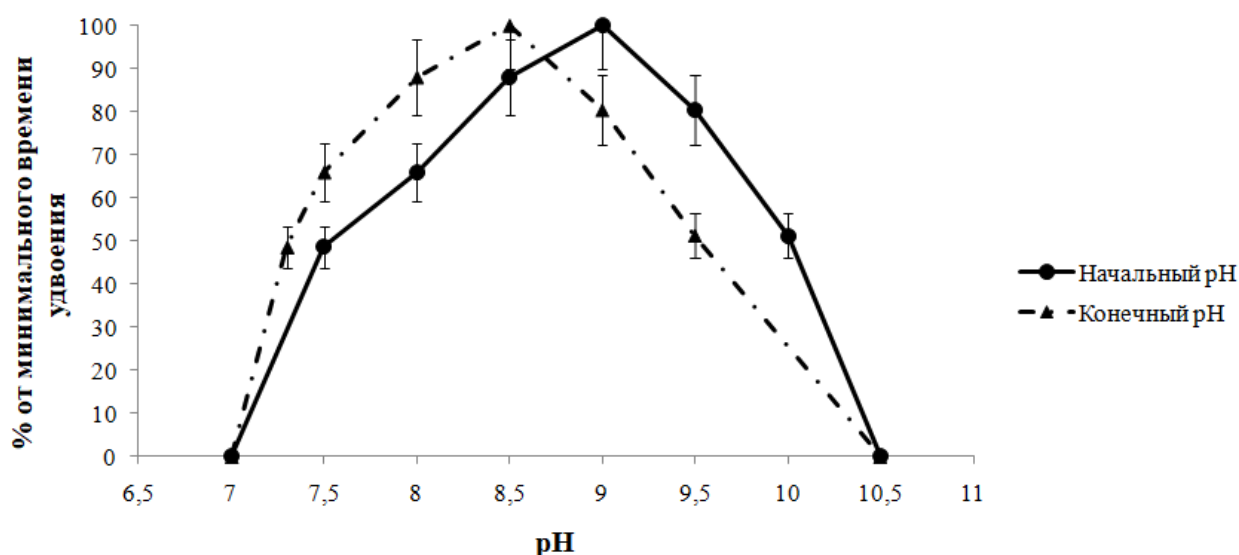


Рисунок 20. Влияние pH на скорость роста штамма FN5suc^T (при 30 °C).

4.5.3 Метаболизм штамма FN5suc^T

Штамм FN5suc^T является строго анаэробной бактерией: он не способен расти ни в аэробных условиях (под 100% воздухом), ни в микроаэробных условиях (3,0%, O₂) с сахарозой в качестве донора электронов. Рост в присутствии восстановителя — Na₂S•9H₂O (0,5 г/л) в среде был значительно лучше, чем при отсутствии сульфида. Штамм FN5suc^T сбраживает целлобиозу (20 мМ), D-фруктозу (5 мМ), галактозу (10 мМ), D-глюкозу (5 мМ), лактозу, мальтозу, маннозу, раффинозу, рибозу, сахарозу, трегалозу, D-

ксилозу, пируват (по 10 мМ), дрожжевой экстракт (1 г/л). Ни один из следующих субстратов не используется в качестве донора электронов: пектин, крахмал, ксилан (по 1 г/л каждый), формиат, фумарат (по 20 мМ каждый), сукцинат, лактат, цитрат (по 10 мМ каждый), малат (5 мМ), метанол, этанол (по 10 мМ), полигалактуроновая кислота, галактуроновая кислота, пептон и триптон (1 г/л). Конечными продуктами сбраживания глюкозы (10 мМ) являлись ацетат (5,95 мМ) и CO₂; водород и формиат обнаруживались в следовых концентрациях (<0,75 мМ каждый). Ни один из следующих потенциальных акцепторов электронов не используется изолятом: сульфат натрия (14 мМ), сульфит (5 мМ), тиосульфат (15 мМ), элементарная сера (5 г/л), нитрат (10 мМ), нитрит (2,5 мМ) и ферригидрит (90 мМ Fe(III) л⁻¹).

4.5.4 Состав жирных кислот мембран штамма FN5suc^T

Клеточные жирные кислоты штамма FN5suc^T были представлены смесью неразветвлённых насыщенных и ненасыщенных кислот: C16:0 (38,9%), C16:1 ω7c (21,4%) и мононенасыщенный диметилацеталь C14:1 (15,6%). Также были обнаружены мононенасыщенный диметилацеталь C14:0 (5,6%), C14:0 (4,9%), C18:1 ω9c (4,7%) и C18:0 (1,9%).

4.5.5 Геносистематические характеристики штамма FN5suc^T

Геном штамма FN5suc^T, собранный из 223 контигов, имеет общую длину 3.354.536 п.о. и значение N50 40127 п.о. Содержание Г+Ц геномной ДНК составляет 37,0 %. Геном содержит 3163 нуклеотидных последовательностей кодирующих белки и 41 генов РНК. Большинство аннотированных генов отвечает за метаболизм углеводов (190), синтез аминокислот и производных (188), метаболизм белков (106), нуклеотиды и нуклеозиды (90), кофакторы, витамины, простетические группы и образование пигментов (73) (Рис. 21).

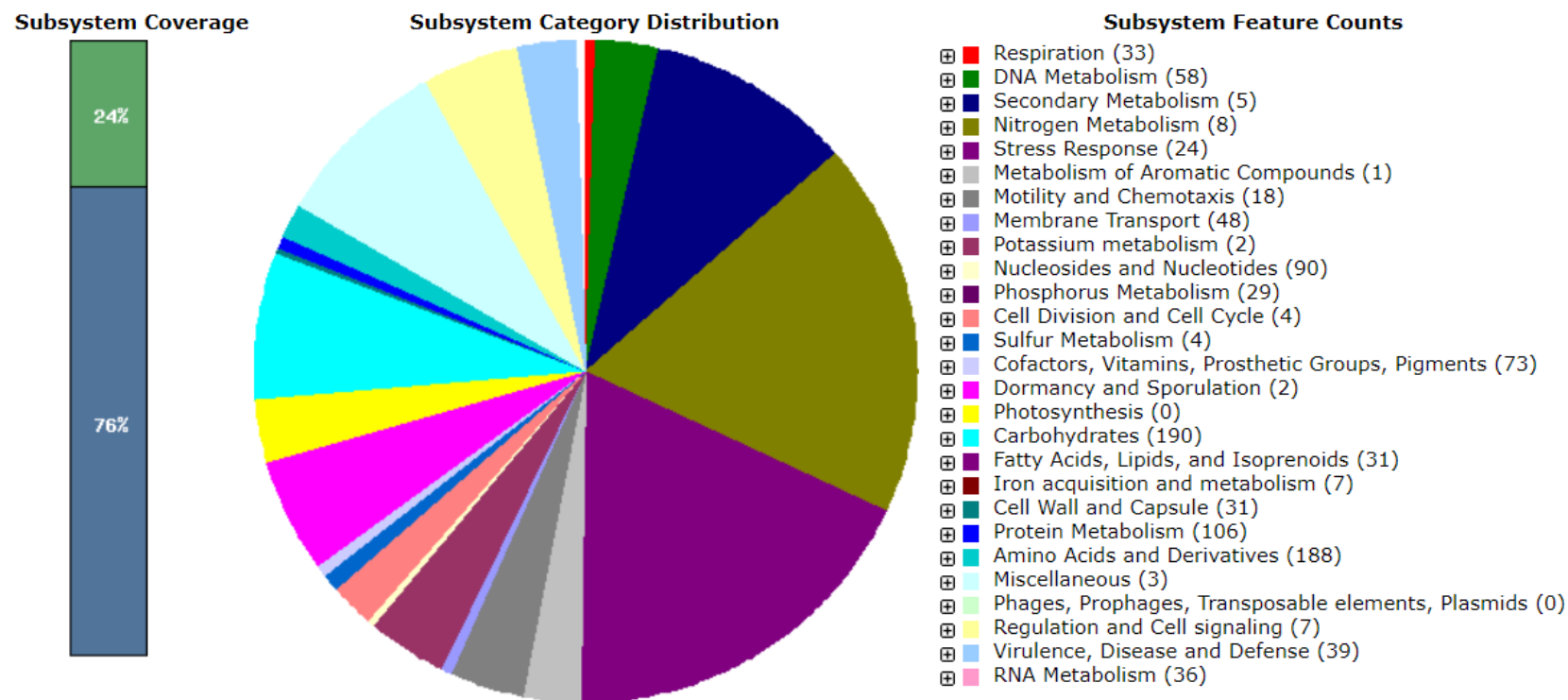


Рисунок 21. Распределение по категориям подсистем основных генов, кодирующих белок штамма FN5suc^T, аннотированных сервером аннотаций RAST. Гистограмма показывает охват подсистемы в процентах (зеленая полоса соответствует проценту белков, включенных в подсистему, а синяя полоса соответствует проценту белков, не включенных в подсистему). Круговая диаграмма показывает процентное распределение наиболее распространенных категорий подсистем.

4.5.5.1. Анализ генома штамма FN5suc^T

Штамм FN5suc^T содержит в своём геноме все необходимые гены гликолиза/глюконеогенеза (референсные гены здесь и далее Табл. П5). Путь Энтнера-Дудорова и пентозофосфатный путь не полный, что является характерной особенностью ряда грамположительных бактерий. Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) не полный из-за отсутствия генов сукцинил-КоА-синтетазы.

Способность штамма FN5suc^T использовать пятиуглеродные моносахариды в качестве донора электронов подтверждает присутствие в его геноме трёх генных кластеров, кодирующих ксилулозо киназу, одного из ключевых ферментов преобразования D-ксилозы и L-арабинозы, и ксилулозо-изомеразу, фермента, кодирующего взаимопреобразования D-ксилозы и D-ксилулозы.

Геном штамма FN5suc^T содержит также кластер из восьми генов, кодирующих ферментный комплекс нитрогеназы (*nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE*, *nifB*, *nifN* и два гена азотной регуляции семейства P-II), подтверждая тем самым способность данного микроорганизма к фиксации N₂. Кластер генов тетрамерной (Fe-Fe) гидрогеназы, гомологичной *hndA*, *hndB*, *hndC*, *hndD*, кодирующие цитозольную НАДФ-восстанавливающую гидрогеназу у *Desulfovibrio fructosivorans*, содержится в геноме штамма FN5suc^T. В геноме штамма FN5suc^T идентифицированы гены, кодирующие матуразу гидрогеназы (FeFe) (HydEFG), участвующую в синтезе и внедрении дижелезного центра, и НАДН-дегидрогеназу RNF-типа, *rnfABCDEG*, обеспечивающую транслокацию протона/иона натрия через мембрану в сочетании с обратимым окислением восстановленного ферредоксина НАД⁺ (Westphal et al., 2018).

Геном штамма FN5suc^T также содержит многочисленные транспозазы, интегразы, АТФ-азы и АВС-транспортеры. В геноме штамма FN5suc^T обнаружен полный набор генов сборки жгутиков.

4.5.5.2 Филогенетическое положение штамма FN5suc^T

Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК штамма FN5suc^T, полученные путём амплификации с универсальными бактериальными праймерами и из полногеномных данных, были идентичными. Сравнение 1530 нуклеотидов гена 16S рРНК штамма FN5suc^T с нуклеотидными последовательностями баз данных NCBI и EzBio Cloud показало, что новый изолят принадлежит к роду *Petrocella*. Ближайшим родственным штамму FN5suc^T микроорганизмом является единственный представитель рода, *P. atlantisensis* (98,4 %). Реконструкция филогенетического дерева гена 16S рРНК штамма FN5suc^T показала, что штамм представляет собой монофилетическую ветвь, четко отделенную от наиболее близких видов (Рис. 22).

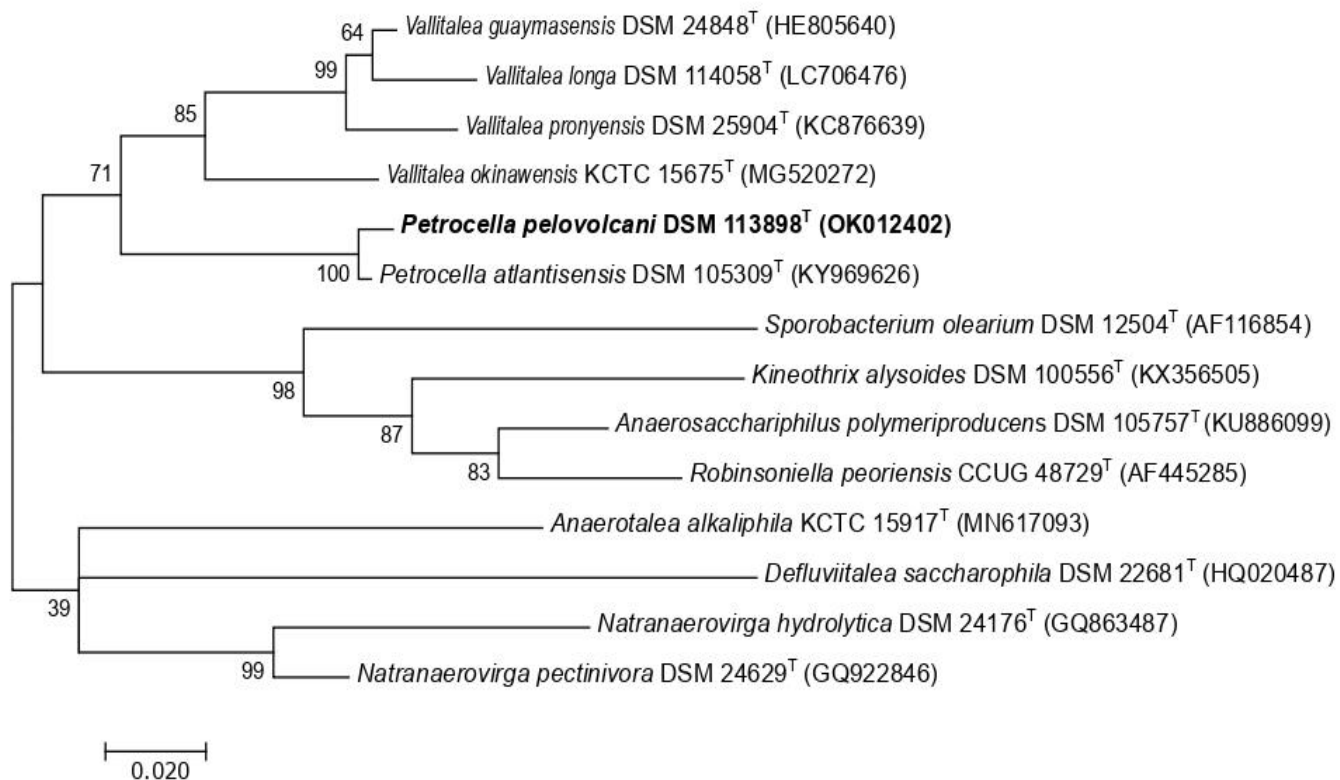


Рисунок 22. Филогенетическое дерево, основанное на последовательностях гена 16S рРНК, показывающее положение штамма FN5suc^T и родственных ему микроорганизмов. Дерево было реконструировано методом maximum-likelihood. Деревья, построенные с помощью алгоритмов neighbor-joining и minimum-evolution, отображали одинаковую топологию. Каждое число указывает значение начальной загрузки из 1000 повторностей. Бар, 0,020 замен на нуклеотидное положение. Идентификационные номера GenBank указаны в скобках.

Значения ANI и *in silico* ДНК-ДНК гибридизации между штаммом FN5suc^T и *P. atlantisensis* составляли 85,19 % и 29,7 %, соответственно, что значительно ниже порога разграничения видов.

4.5.6 Сравнение ключевых характеристик штамма FN5suc^T с другим представителем рода *Petrocella*

Так же, как и ближайший родственный новому изоляту микроорганизм *P. atlantisensis*, штамм FN5suc^T является анаэробной мезофильной палочкой с ферментативным типом метаболизма, однако отличается диапазонами pH и солёности, а также списком используемых субстратов (Табл. 19). Наиболее существенным отличием является оптимальный pH: *P. atlantisensis* является нейтрофильной бактерией, чей pH оптимум составляет 7,4 – 8,0, а диапазон роста – 5,6 – 9,2. Штамм FN5suc^T не способен расти при значениях pH ниже 7.5, а оптимальный уровень pH для него составляет 9.0.

Таблица 19. Дифференцирующие характеристики штамма FN5suc^T и родственного ему микроорганизма *P. atlantisensis* 1. Штамм FN5suc^T (Frolova et al., 2024); 2. *P. atlantisensis* (Quéméneur et al., 2019) Оба штамма используют целлобиозу, D-фруктозу, галактозу, D-глюкозу, лактозу, мальтозу, маннозу, раффинозу, сахарозу, трегалозу, пируват, ДЭ. Н.д. – данные в литературных источниках отсутствуют.

Характеристика	1	2
Диапазон pH (оптимум)	7,5 – 10,0 (9,0)	5,6 – 9,2 (7,4 – 8,0)
Диапазон температур (°C) (оптимум)	10 – 37 (30)	10 – 35 (25)
Солёность	0,001 – 5,0	0 – 8,0
Использование субстратов		
Ксилоза	+	-
Триптон	-	+
Содержание Г+Ц (%)	37,0	37,3
Основные жирные кислоты	C _{16:0} , C _{16:1 ω7c} , and monounsaturated dimethyl acetal C _{14:1}	C _{16:1 ω7c} , C _{16:0} , C _{16:1 ω7c} DMA
Источник выделения	Наземный грязевой вулкан	Подводная скала

Таким образом, на основании проведенных исследований мы предлагаем отнести штамм FN5suc^T к новому виду рода *Petrocella* – *Petrocella pelovolcani* sp. nov.

Описание *Petrocella pelovolcani* sp. nov.

Petrocella pelovolcani (pe.lo.vol.ca'ni. Гр. муж. сущ. *pélos*, грязь; Н.лат. муж. сущ. *Volcanus*, бог огня, вулкан; Н.лат. жен. прил. *pelovolcani*, из грязевого вулкана, так как этот вид был выделен из грязевого вулкана).

Подвижные палочки диаметром 0,3–0,5 мкм и длиной 2,0–2,5 мкм. Растет поодиночке или парами. Образование эндоспор не наблюдается. Диапазон температур роста 10–37 °С, оптимум 30 °С. Диапазон pH для роста составляет 7,5–10,0 с оптимумом pH 9,0. Рост при концентрации NaCl от 0,001 до 5,0 % (мас./об.). Строгий анаэроб. Сбраживает целлобиозу, D-фруктозу, галактозу, D-глюкозу, лактозу, мальтозу, маннозу, раффинозу, рибозу, сахарозу, трегалозу, D-ксилозу, пируват и дрожжевой экстракт. Продуктами сбраживания глюкозы являются ацетат, CO₂ и следовые количества H₂ и формиата. Не использует пектин, крахмал, ксилан, формиат, фумарат, сукцинат, лактат, цитрат, малат, метанол, этанол, полигалактуроновую кислоту, галактуроновую кислоту, пептон и триптон. Не восстанавливает сульфат, сульфит, тиосульфат, элементарную серу, нитрат, нитрит и ферригидрит. Основными соединениями клеточных жирных кислот являются C16:0, C16:1 ω7c и мононенасыщенный диметилацеталь C14:1. Геном типового штамма имеет размер 3.354.536 п.о. и содержание Г+Ц 37,0 %.

Идентификационный номер последовательности 16S рРНК в GenBank/EMBL - OK012402, полногеномная последовательность депонирована в DDBJ/ENA/GenBank под номером JARGDP000000000.

Типовой и единственный штамм FN5suc^T депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) под номером DSM 113898^T и в Коллекцию UNIQEM под номером UQM 41591^T.

4.6. Географическое распространение родов микроорганизмов, исследованных в данной работе и их встречаемость в различных местообитаниях

Для анализа таксономического состава микробных сообществ широко используются методы высокопроизводительного секвенирования. Однако базы данных нуклеотидных последовательностей, полученных такими методами, все еще находятся в стадии формирования. Данные методы основаны на использовании коротких (200 – 500 нуклеотидов) гипервариабельных участков генов 16S рРНК, что представляется недостаточным для абсолютной уверенности в систематической принадлежности микроорганизма к тому или иному роду. В ходе работы для оценки географического распространения родов, к которым относятся выделенные нами новые изоляты, нами были проанализированы содержащиеся в базе данных Genbank последовательности культивируемых и некультивируемых (филотипов) микроорганизмов, длина которых составляла бы не менее 1400 нуклеотидов и которые относятся к тому же роду, что и описанные в ходе выполнения работы микроорганизмы.

В базе данных не оказалось организмов, имеющих сходство с *Anaerotalea alkaliphila* на уровне рода. Ближайшая некультивируемая бактерия, выделенная из колонии кораллов Багамских островов, имеет 91.77% сходства генов 16S рРНК и относится к другому роду.

Оценка распространенности рода *Pseudodesulfovibrio* показала, что его представители в количестве 96 клонов были детектированы молекулярными методами или выделены в чистые культуры из самых разнообразных местообитаний: как пресноводных, так и морских источников и даже из солоноватых озер. В Табл. 20 были включены только первые 10 записей.

Род *Sulfurospirillum* в базе данных Genbank, напротив, представлен в основном антропогенными источниками обитания: нефтяными резервуарами,

нефтяными скважинами и сточными водами Китая, Японии и Канады (более 100 клонов). Представители данного рода наряду с представителями рода *Pseudodesulfovibrio* используют широкий спектр субстратов для роста, чем, вероятно, можно объяснить и большое количество описанных внутри этих родов микроорганизмов, и их повсеместное распространение.

Род *Desulfobotulus* в базе данных Genbank представлен в ограниченном количестве (11 клонов): кроме уже известных валидно описанных представителей и выделенного в ходе выполнения работы '*D. pelophilus*' база данных не содержит нуклеотидных последовательностей микроорганизмов, имеющих сходство с изолятом на уровне рода. 16S рРНК *D. alkaliphilus* имела длину меньше 1400 нуклеотидов, по этой причине данный микроорганизм не был включен в таблицу. Представители рода *Desulfobotulus* были выделены из пресноводных местообитаний и из содовых озер.

Род *Petrocella*, хоть и включающий в себя на момент написания работы единственный валидно описанный вид, в базе данных Genbank представлен 8ю записями нуклеотидных последовательностей, детектирующихся в различных естественных (водных или почвенных) и антропогенных (нефтяная скважина) местообитаний. Примечательно, что представитель данного рода детектировался ранее в наземном грязевом вулкане Тайваня (Cheng et al., 2012), однако длина его фрагмента гена 16S рРНК немного меньше 1400 нуклеотидов.

Таблица 20. Географическое распространение родов (согласно базе данных Genbank), к которым относятся новые изоляты*

Организм (номер в GenBank)	Длина п.н.	% сходства генов по 16S рРНК	Место обнаружения	Ссылка
<i>Anaerotalea alkaliphila</i> (NR_173597)	1517		Наземный грязевой вулкан, Краснодарский край, РФ	(Frolova et al., 2021a)
Некульт. бактерия RB_13f (EF123527)	1508	91,77	Колонии кораллов <i>Siderastria sidereal</i> , Багамы	(Sekar et al., 2006)
<i>Pseudodesulfovibrio alkaliphilus</i> (MN705432)	1541		Наземный грязевой вулкан, Краснодарский край, РФ	(Frolova et al., 2021b)
<i>Pseudodesulfovibrio aespoeensis</i> (CP002431)	1540	98,03	Подземный водоносный горизонт, о-в Аспо, Швеция	(Pedersen et al., 2014)
<i>Pseudodesulfovibrio indicus</i> (CP014206)	1541	96,24	Глубоководный осадок, Индийский океан	(Cao et al., 2016)
<i>Pseudodesulfovibrio mercurii</i> (CP003220)	1541	95,72	Мезогалинные отложения, Чесапикский залив	(Brown et al., 2011)
<i>Pseudodesulfovibrio cashew</i> (CP046400)	1541	95,59	Холодный глубоководный сип	(Zheng, Wu, Sun, 2021)
<i>Pseudodesulfovibrio sediminis</i> (AP024485)	1541	95,53	Осадок солоноватого озера	(Takahashi et al., 2022)
Некульт. бактерия <i>Pseudodesulfovibrio</i> SB368 (OR150487)	1488	98,46	Н.д.	Kolganova, Slobodkina, 2023, неопубликованные данные

Таблица 20 (продолжение)

Некульт. бактерия <i>Pseudodesulfovibrio</i> LX102	1514	97,89	Морская вода, Китай	Luan, 2011, неопубликованные данные
Некульт. бактерия <i>Desulfovibrio</i> HS4	1445	97,99	Морские отложения	Dinh, 2010, неопубликованные данные
Некульт. бактерия <i>Desulfovibrio</i> FLR4	1457	97,46	Бескислородная био пленка, Франция	Ranchou-Peyruse, 2012, неопубликованные данные
Некульт. бактерия <i>Desulfovibrio</i> P20	1418	98,17	Морские отложения, Тихий океан	(Fichtel et al., 2012)
'<i>Sulfurospirillum</i> <i>tamanensis</i>' (MW872671)	1473		Наземный грязевой вулкан, Краснодарский край, РФ	(Фролова и др., 2023а)
<i>Sulfurospirillum</i> <i>alkalitolerans</i> (NR_108632)	1437	99,21	Биореактор, Нидерланды	(Sorokin, Tourova, Muyzer, 2013)
Некульт. бактерия PL- 28B12 (AY570614)	1473	99,07	Низкотемпературное нефтяное месторождение, Канада	(Grabowski et al., 2005)
Некульт. бактерия PL- 18B4 (AY570602)	1472	98,93	Низкотемпературное нефтяное месторождение, Канада	(Grabowski et al., 2005)
Некульт. бактерия PL-5B5 (AY570558)	1481	99,21	Низкотемпературное нефтяное месторождение, Канада	(Grabowski et al., 2005)
Некульт. бактерия PL- 14B3 (AY570598)	1479	98,57	Низкотемпературное нефтяное месторождение, Канада	(Grabowski et al., 2005)

Таблица 20 (продолжение)

Некульт. бактерия b-3-3 (MG602817)	1472	98,08	Сточные воды, Китай	Huang, 2017, неопубликованные данные
Некульт. бактерия B18- 43-B01 (JQ088439)	1472	97,86	Нефтяные резервуары, Китай	(Tang et al., 2012)
Некульт. бактерия ARWH-BA02 (AB546014)	1472	97,79	Нефтяные скважины, Япония	(Yamane et al., 2011)
Некульт. бактерия bacA1 (KP987222)	1418	97,95	Резервуар сточных вод, Китай	Dong, 2015, неопубликованные данные
Некульт. бактерия DQB- W28 (GQ415373)	1465	96,58	Нефтяное месторождение, Китай	Ai, 2010, неопубликованные данные
Некульт. бактерия AN- B13A (AM157656)	1473	96,02	Водораздел между гиперсоленой и морской водой, Средиземное море	(Daffonchio et al., 2006)
Некульт. бактерия SRWH- BC07	1471	95,88	Нефтяные скважины, Япония	(Yamane et al., 2011)
<i>'Desulfobotulus pelophilus'</i> (MW872673)	1539		Наземный грязевой вулкан, Краснодарский край, РФ	(Фролова и др., 2023b)
<i>Desulfobotulus mexicanus</i> (KY523541)	1540	98,31	Содовое озеро	(Pérez-Bernal et al., 2020)
<i>Desulfobotulus sapovorans</i> (NR_044601)	1553	97,73	Пресный водоем	(Kuever, Rainey, Widdel, 2015)
Некульт. бактерия	1506	92,55	Коралл <i>Montastraea</i>	(Sunagawa et al., 2009)

Таблица 20 (продолжение)

SGUS549 (FJ202843)			<i>faveolata</i> , Карибское море	
'<i>Petrocella pelovolcania</i>' (OK012402)	1530		Наземный грязевой вулкан, Краснодарский край, РФ	(Frolova et al., 2024)
Некульт. бактерия B173 (KJ817633)	1491	98,99	Рифтовое озеро Эби-нур, Китай	Han, 2014, неопубликованные данные
Некульт. бактерия NRB19 (HM041936)	1492	98,79	Нефтяная скважина Ниибори, Япония	(Kobayashi et al., 2012)
<i>Petrocella atlantisensis</i> (NR_164620)	1490	98,39	Поддонные горные породы, Атлантический океан	(Quéméneur et al., 2019)
Некульт. бактерия SYNH02 (JQ245554)	1373	98,91	Наземный грязевой вулкан, Тайвань	(Cheng et al., 2012)

*включены только первые 10 записей

Оценить географическую распространенность тех или иных бактериальных родов можно при помощи интернет-ресурса GBIF (Global Biodiversity Information Facility) (<https://doi.org/10.15468/39omei>), являющимся глобальным информационным фондом по биоразнообразию и содержащего записи нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и географические координаты источников выделения. Данный ресурс не содержит географических координат детектирования представителей родов *Anaerotalea* и *Petrocella*, выделенных в ходе выполнения работы. Роды *Pseudodesulfovibrio*, *Desulfobotulus* и *Sulfurospirillum* содержат 299, 1331 и 7422 геопривязанных записи, соответственно. Стоит, однако, отметить, что обновление базы данных, по-видимому, происходит не столь оперативно: последние обновления по родам *Pseudodesulfovibrio* и *Desulfobotulus* детектируются 2018, а для рода *Sulfurospirillum* - 2021 годами. Впрочем, несмотря на этот факт, определенные выводы о распространенности тех или иных микроорганизмов сделать возможно: широкая распространенность рода *Sulfurospirillum* легко объяснить большим количеством видов, относящихся к нему. С другой стороны, род *Desulfobotulus* насчитывает значительно меньше представителей, чем род *Pseudodesulfovibrio*, и для его представителей характерен гораздо более узкий круг используемых субстратов. Впрочем, большинство представителей рода *Pseudodesulfovibrio* были выделены после последнего обновления базы данных GBIF и, вероятно, поэтому не были в нее включены.

База данных Silva (версия SSU r138.1, <https://www.arb-silva.de>) также позволяет оценить распространенность таксонов, однако, как и ресурс GBIF не содержит записей нуклеотидных последовательностей представителях родов *Anaerotalea* и *Petrocella*. Стоит отметить, что данный ресурс располагает еще более ограниченным количеством нуклеотидных последовательностей, чем GBIF: встречается 1768, 28 и 12 записи генов 16S рРНК представителей родов *Sulfurospirillum*, *Pseudodesulfovibrio* и

Desulfobotulus, соответственно. Анализ данных интернет-ресурсов Silva и GBIF позволяет сделать однозначный вывод о распространенности таксонов, выделенных в ходе выполнения работы: к широко географически и экологически распространенным таксонам можно отнести роды *Sulfurospirillum* и *Pseudodesulfovibrio*, а к таксонам, имеющим гораздо более ограниченную распространенность, представителей родов *Desulfobotulus*, *Anaerotalea* и *Petrocella*.

Сравнение географической распространенности родов, к которым относятся выделенные в ходе выполнения работы изоляты, в разных базах данных представлено в Табл. 21.

Таблица 21. Число нуклеотидных последовательностей родов исследованных микроорганизмов в разных базах данных

База данных	Genbank	GBIF	SILVA
Род			
<i>Anaerotalea</i>	0	0	1
<i>Pseudodesulfovibrio</i>	96	299	83
<i>Sulfurospirillum</i>	229	7422	1768
<i>Desulfobotulus</i>	11	1331	229
<i>Petrocella</i>	8	0	25

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения данной работы были выделены и охарактеризованы новые таксоны алкалофильных анаэробных микроорганизмов из наземных грязевых вулканов. Источник выделения является объектом особенного научного интереса, поскольку к моменту начала работы были известны лишь немногочисленные культивируемые микроорганизмы населяющие НГВ.

Все описанные в данной диссертации 5 чистых культур анаэробных бактерий, представляют новые таксоны различного ранга. *Pseudodesulfovibrio alkaliphilus* стал одиннадцатым, а '*Sulfurospirillum tamanensis*' – девятым видами в соответствующих родах, существенно при этом расширив имеющиеся знания о их физиологии и возможной экологической роли. Так, для рода *Pseudodesulfovibrio* была впервые продемонстрирована способность к автотрофному росту. Помимо этого все представители рода, известные к моменту начала работы, являлись нейтрофилами с оптимальным рН роста около 7.0, а выделенный изолят стал первым облигатным алкалофилом с оптимальным рН 9.5 и не был способен расти при рН ниже 7.0. Внутри рода *Sulfurospirillum*, преимущественно также состоящего из нейтрофильных микроорганизмов, ранее был описан алкалитолератный представитель, *S. alkalitolerans* с оптимальным рН 8.5. Описанный в ходе работы '*S. tamanensis*' стал первым алкалофильным представителем рода с оптимальным рН 9.0.

'*Desulfobotulus pelophilus*' стал четвертым описанным микроорганизмом внутри рода *Desulfobotulus*, среди которых уже встречаются и алкалофильные, и алкалотолератные представители. '*Petrocella pelovolcania*' является вторым описанным и единственным алкалофильным видом внутри рода *Petrocella*. *Anaerotalea alkaliphila* является первым описанным видом для рода *Anaerotalea*. Интересно отметить, что и

Anaerotalea и *Petrocella* принадлежат к семейству *Vallitaleaceae* (порядок *Lachnospirales*, класс *Clostridia*, GTDB Taxonomy). Вероятно, представители именно этого семейства имеют конкурентные преимущества при культивировании в анаэробных условиях при щелочных значениях pH на простых органических соединениях в качестве субстрата. Все выделенные микроорганизмы являются первыми представителями внутри родов, которые были выделены из наземных грязевых вулканов. Все они при этом являются алкалофилами, имея оптимальный pH от 9.0 и выше и не способны расти при значениях pH ниже 7.0. Выделенные в ходе выполнения работы изоляты имеют диапазоны pH, температуры и солености, близкие к параметрам в их среде обитания. Несмотря на то, что микроорганизмы были выделены с разными донорами и акцепторами электронов, всех их объединяет свойство расти за счет сбраживания различных углеродных соединений, которые могут выделяться из подземных отложений или попадать в наземные грязевые вулканы через поверхностные потоки.

ВЫВОДЫ

1. Доказана способность микроорганизмов, выделенных из наземных грязевых вулканов, к устойчивому росту за счёт окисления или восстановления соединений серы и восстановления нитрата, что указывает на существование биогеохимических циклов серы и азота в этих местообитаниях.
2. Выделены и охарактеризованы 5 новых таксонов анаэробных бактерий – новый род *Anaerotalea alkaliphila* gen. nov., sp. nov., и 4 новых вида, ранее известных родов - *Pseudodesulfovibrio alkaliphilus* sp. nov., *Sulfurospirillum tamanensis* sp. nov., *Desulfobotulus pelophilus* sp. nov., *Petrocella pelovolcania* sp. nov.
3. Метаболический потенциал, кодируемый в геномах выделенных штаммов, соответствует фенотипическим данным. Геномы содержат гены ферментов основных путей энергетического метаболизма серы и азота, а также путей ассимиляции углерода, фиксации молекулярного азота и гидрогеназ.
4. Выделенные микроорганизмы относятся как к широко географически распространенным группам, встречаемым в различных биотопах (роды *Pseudodesulfovibrio*, *Sulfurospirillum*), так и к группам, имеющим ограниченное распространение (роды *Anaerotalea*, *Petrocella*).

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Алиев А.А. Грязевой вулканизм Южно-Каспийского нефтегазоносного бассейна // Геология и полезные ископаемые Мирового океана. – 2006. – № 3. – С. 35-51.
2. Болдарева Е.Н., Брянцева И.А., Цапин А., Нильсон К., Сорокин Д.Ю., Турова Т.П., Бойченко В.А., Стадничук И.Н., Горленко В.М. Новая галоалкалофильная бактериохлорофилл а содержащая бактерия *Roseinatronobacter monicus* sp. nov. из гиперсолоненного содового озера Моно Лейк (Калифорния, США) // Микробиология. – 2007. – Т. 76. – № 1. – С. 95-106.
3. Гарькуша Д.Н., Фёдоров Ю.А. Глобальная эмиссия метана геологическими источниками // МНИЖ. – 2019. – № 3(81) – С. 37-51.
4. Геологический словарь. 1973. Т. 1. Издание 2. Недра, Москва. 1973 г. 488 с.
5. Гнатенко Г.И., Кутний В.А., Науменко П.И., Соболевский Ю.В., Шнюков Е.Ф. Грязевые вулканы Керченско-Таманской области (атлас) // Киев. – Наукова Думка. – 1986. – 149 с.
6. Губкин И.М., Федоров С.Ф. Грязевые вулканы Советского Союза и их связь с генезисом нефтяных месторождений Крымско-Кавказской геологической провинции // Издательство Академии наук СССР. – Москва-Ленинград. – 1938. – 43 с.
7. Гулиев И.С., Павленкова Н.И., Раджабов М.М. Зона регионального разуплотнения в осадочном чехле Южно-Каспийской впадины // Литология и полезные ископаемые. – 1988. – № 5. – С. 123–136.
8. Деткова Е.Н. Связь между стратегией осмоадаптации, аминокислотным составом общего клеточного белка и свойствами некоторых ферментов галоалкалофильных бактерий // Микробиология. – 2006. – Т. 75. – № 3. – С. 312-319.
9. Деткова Е.Н. Осмоадаптация галоалкалофильных бактерий: роль осморегуляторов и возможности их практического применения // Микробиология. – 2007. – Т. 76 – № 5. – С. 581-593.
10. Жилина Т.Н., Заварзин Г.А. Методы выделения и культивирования метанобразующих бактерий // Теоретические и методические основы изучения анаэробных микроорганизмов. Пушино. – 1978. – С. 68-90.

11. Жилина Т.Н., Кевбрин В.В., Турова Т.П., Лысенко А.М., Кострикина Н.А., Заварзин Г.А. *Clostridium alkalicellum* sp. nov. – облигатно алкалофильный целлюлозолитик из содового озера Прибайкалья // Микробиология. – 2005. – Т. 74. – С. 642-653.
12. Заварзин Г.А. Эпиконтинентальные содовые водоемы как предполагаемые реликтовые биотопы формирования наземной биоты // Микробиология. – 1993. – Т.62. – С.789-800.
13. Заварзин Г.А. Содовые озера — природная модель древней биосферы 140 континентов // Природа. – 2000. – № 2. – С. 45-55.
14. Заварзин Г.А. Образование содовых условий как глобальный процесс // Труды Института микробиологии им. С. Н. Виноградского. Вып. 14. Алкалофильные микробные сообщества. Под ред. В.Ф. Гальченко. М.: Наука. – 2007. – С. 8-57.
15. Исаев В.П. Грязевый вулкан Тельный в озере Байкал // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Науки о Земле. – 2015. – № 11. – С. 30-37
16. Лаврушин В.Ю. Подземные флюиды Большого Кавказа и его обрамления (Труды ГИН РАН). – 2012. – М.: ГЕОС. 348 с.
17. Лимонов А.Ф. Грязевые вулканы // Соросовский образовательный журнал – 2004. – 8 – № 1. – С. 63-69.
18. Петрович И.В. Грязевый вулкан Тельный в озере Байкал // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Науки о Земле. – 2015. – Т. 11. – С. 30–37.
19. Рахманов Р.Р. Грязевые вулканы и их значение в прогнозировании газонефтеносности недр // М.: Недра. – 1987. – 174 с.
20. Сорокин Д.Ю., Турова Т.П., Кузнецов Б.Б., Брянцева И.А., Горленко В.М. *Roseinatronobacter thiooxidans* gen. nov., sp.nov. – новая алкалофильная аэробная бактериохлорофилл а-содержащая бактерия, выделенная из содового озера // Микробиология. – 2000. – Т. 69. – № 1. – С. 89-97.
21. Фролов Е.Н. Сульфатредуцирующие прокариоты кислых термальных источников полуострова Камчатка // Дис. канд. биол. наук: 03.02.03 - ФИЦ Биотехнологии РАН. – Москва. – 2017 – 142 с.
22. Фролова А.А., Меркель А.Ю., Кевбрин В.В., Копицын Д.С., Слободкин А.И. *Sulfurospirillum tamanensis* sp. nov., факультативно анаэробная

- алкалифильная бактерия из наземного грязевого вулкана // Микробиология. 2023а. – Т. 92. – № 1. – С. 14-23.
23. Фролова А.А., Меркель А.Ю., Кучиерская А.А., Слободкин А.И. *Desulfobotulus pelophilus* sp. nov., – алкалифильная сульфатовосстанавливающая бактерия из наземного грязевого вулкана // Микробиология. – 2023б. – Т. 92. – № 4. – С. 358-365.
24. Холодов В.Н. Грязевые вулканы: закономерности размещения и генезис. Грязевулканические провинции и морфология грязевых вулканов // Литология и полезн иск. – 2002. – № 3. – С. 227-241.
25. Холодов В.Н. Грязевые вулканы: распространение и генезис // Литология и полезн. иск. – 2012. – № 4. – С. 5-27.
26. Холодов В.Н. О происхождении грязевых вулканов // ГПИМО. – 2019. – № 4(58). – С. 57-80.
27. Шнюков Е.Ф. Грязевые вулканы Керченско-Таманского региона // Краснодар: ГлавМедиа. – 2005. – 176 с.
28. Шнюков Е.Ф., Алиев Ад.А., Рахманов Р.Р. Грязевой вулканизм Средиземного, Черного и Каспийского морей: специфика развития и проявления // ГПИМО. – 2017. – № 2(48). – С. 5-25.
29. Шнюков Е.Ф., Нетребская Е.Я. Корни черноморских грязевых вулканов // ГПИМО. – 2013. – №1(31). – С. 87-92.
30. Якубов А.А., Ализаде А.А., Зейналов М.М. Грязевые вулканы Азербайджанской ССР. Атлас. // Баку: Изд-во АН Азербайджанской ССР. – 1971. – 258 с.
31. Якубов А.А., Григорьянц Б.В., Алиев Ад.А., Бабазаде А.Д., Велиев М.М., Гаджиев Я.А., Гусейнзаде И.Г., Кабулова А.Я., Кастрюлин Н.С., Матанов Ф.А., Мустафаев М.Г., Рахманов Р.Р., Сафарова О.Б., Сеидов А.Г. Грязевой вулканизм Советского Союза и его связь с нефтегазоносностью // Баку: Изд-во «Элм». – 1980. – 167 с.
32. Abildgaard L., Nielsen M.B., Kjeldsen K.U., Ingvorsen K. *Desulfovibrio alkalitolerans* sp. nov., a novel alkalitolerant, sulphate-reducing bacterium isolated from district heating water // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2006. – V. 56. – Iss. 5. – P. 1019–1024.
33. Alain K., Holler T., Musat F., Elvert M., Treude T., Krüger M. Microbiological investigation of methane- and hydrocarbon-discharging mud volcanoes in the

Carpathian Mountains, Romania // *Environ Microbiol.* – 2006. – V. 8. – № 4. – P. 574–590.

34. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // *Nucleic Acids Res.* – 1997. – V. 25. – № 17. – P. 3389–3402.

35. Anil Kumar P., Srinivas T.N., Madhu S., Manorama R., Shivaji S. *Indibacter alkaliphilus* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic bacterium isolated from a haloalkaline lake // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2010a. – V. 60. – Iss. 4. – P. 721–726.

36. Anil Kumar P., Srinivas T.N.R., Pavan Kumar P., Madhu S., Shivaji S. *Nitritalea halalkaliphila* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic bacterium of the family ‘Cyclobacteriaceae’, phylum Bacteroidetes // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2010b. – V. 60. – Iss. 10. – P. 2320–2325.

37. Arun A.B., Young C.C., Chen W.M., Hung M.H., Lai W.A., Chou J.H., Rekha P.D., Shen F.T., Su S.P. *Belliella pelovolcani* sp. nov., isolated from a mud-volcano in Taiwan // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2009. – V. 59. – Iss. 10. – P. 2534–2537.

38. Bale S.J., Goodman K., Rochelle P.A., Marchesi J.R., Fry J.C., Weightman A.J., Parkes R.J. *Desulfovibrio profundus* sp. nov., a novel barophilic sulfate-reducing bacterium from deep sediment layers in the Japan Sea // *Int J Syst Bacteriol.* – 1997. – V. 47. – № 2. – P. 515–521.

39. Baloglanov E.E., Abbasov O.R., Akhundov R.V. Mud volcanoes of the world: classifications activities and environmental hazard (informational-analytical review) // *European Journal of Natural History.* – 2018. – № 5. – P. 12–26.

40. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // *J Comput Biol.* – 2012. – V. 19. – № 5. – P. 455–477.

41. Bassil N.M., Lloyd J.R. *Anaerobacillus isosaccharinicus* sp. nov., an alkaliphilic bacterium which degrades isosaccharinic acid // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2019. – V. 69. – Iss. 12. – P. 3666–3671.

42. Ben Aissa F., Postec A., Erauso G., Payri C., Pelletier B., Hamdi M., Ollivier B., Fardeau M.L. *Vallitalea pronyensis* sp. nov., isolated from a marine alkaline

hydrothermal chimney // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2014. – V. 64. – Iss. Pt 4. – P. 1160–1165.

43. Ben Ali Gam Z., Oueslati R., Abdelkafi S., Casalot L., Tholozan J.L., Labat M. *Desulfovibrio tunisiensis* sp. nov., a novel weakly halotolerant, sulfate-reducing bacterium isolated from exhaust water of a Tunisian oil refinery // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2009. – V. 59. – Iss. Pt 5. – P. 1059–1063.

44. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Rapp B.A., Wheeler D.L. GenBank // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – V. 28. – № 1. – P. 15–18.

45. Bhatt H.B., Azmatunnisa Begum M, Chintalapati S, Chintalapati VR, Singh SP. *Desertibacillus haloalkaliphilus* gen. nov., sp. nov., isolated from a saline desert // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2017. – V. 67. – Iss. 11. – P. 4435–4442.

46. Bird L.J., Kuenen J.G., Osburn M.R., Tomioka N., Ishii S., Barr C., Nealson K.H., Suzuki S. *Serpentinimonas* gen. nov., *Serpentinimonas raichei* sp. nov., *Serpentinimonas barnesii* sp. nov. and *Serpentinimonas maccroryi* sp. nov., hyperalkaliphilic and facultative autotrophic bacteria isolated from terrestrial serpentinizing springs // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2021. – V. 71. – Iss. 8. – article 004945. doi: 10.1099/ijsem.0.004945.

47. Borchert M.S., Nielsen P., Graeber I., Kaesler I., Szewzyk U., Pape T., Antranikian G., Schäfer T. *Bacillus plakortidis* sp. nov. and *Bacillus murimartini* sp. nov., novel alkalitolerant members of rRNA group 6 // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2007. – V. 57. – Iss. Pt 12. – P. 2888–2893.

48. Borsodi A.K., Segers P., Coenye T., Vancanneyt M., Vandamme P. *Pannonibacter phragmitetus* gen. nov., sp. nov., a novel alkalitolerant bacterium isolated from decomposing reed rhizomes in a Hungarian soda lake // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2003. – V. 53. – Iss. 2. – P. 555–561.

49. Borsodi A.K., Aszalós J.M., Bihari P., Nagy I., Schumann P., Spröer C., Kovács A.L., Bóka K., Dobosy P., Óvári M., Szili-Kovács T., Tóth E. *Anaerobacillus alkaliphilus* sp. nov., a novel alkaliphilic and moderately halophilic bacterium // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2019. – V. 69. – Iss 3. – P. 631–637.

50. Brettin T., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Gerdes S., Olsen G.J., Olson R., Overbeek R., Parrello B., Pusch G.D., Shukla M., Thomason J.A. 3rd, Stevens R, Vonstein V., Wattam A.R., Xia F. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes // *Sci Rep.* – 2015. – V. 5. – article 8365. doi: 10.1038/srep08365.
51. Brown S.D., Gilmour C.C., Kucken A.M., Wall J.D., Elias D.A., Brandt C.C., Podar M., Chertkov O., Held B., Bruce D.C., Detter J.C., Tapia R., Han C.S., Goodwin L.A., Cheng J.F., Pitluck S., Woyke T., Mikhailova N., Ivanova N.N., Han J., Lucas S., Lapidus A.L., Land M.L., Hauser L.J., Palumbo A.V. Genome sequence of the mercury-methylating strain *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 // *J Bacteriol.* – 2011. – V. 193. – № 8. – P. 2078–2079.
52. Camerlenghi A., Cita M.B., Hieke W., Ricchiuto T. Geological evidence for mud diapirism on the Mediterranean Ridge accretionary complex // *Earth and Planetary Science Letters.* – 1992. – V. 109. – № 3. – P. 493–504.
53. Cao J., Gayet N., Zeng X., Shao Z., Jebbar M., Alain K. *Pseudodesulfovibrio indicus* gen. nov., sp. nov., a piezophilic sulfate-reducing bacterium from the Indian Ocean and reclassification of four species of the genus *Desulfovibrio* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2016. – V. 66. – Iss. 10. – P. 3904–3911.
54. Capella-Gutiérrez S., Silla-Martínez J.M., Gabaldón T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses // *Bioinformatics.* – 2009. – V. 25. – № 15. – P. 1972–1973.
55. Caumette P., Cohen Y., Matheron R. Isolation and characterization of *Desulfovibrio halophilus* sp. nov., a halophilic sulfate-reducing bacterium isolated from Solar Lake (Sinai) // *Systematic and Applied Microbiology.* – 1991. – V. 14. – № 1. – P. 33–38.
56. Cha J.-H., Cha C.-J. *Gordonia alkaliphila* sp. nov., an actinomycete isolated from tidal flat sediment // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2013. – V. 63. – Iss. Pt_1. – P. 327–331.
57. Chao H.-C., You C.-F., Sun C.-H. Gases in Taiwan mud volcanoes: Chemical composition, methane carbon isotopes, and gas fluxes // *Applied Geochemistry.* – 2010. – V. 25. – № 3. – P. 428–436.
58. Cheng T.-W., Chang Y.H., Tang S.L., Tseng C.H., Chiang P.W., Chang K.T., Sun C.H., Chen Y.G., Kuo H.C., Wang C.H., Chu P.H., Song S.R., Wang P.L., Lin L.H. Metabolic stratification driven by surface and subsurface interactions in a terrestrial mud volcano // *ISME J.* – 2012. – V. 6. – № 12. – P. 2280–2290.

59. Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R., da Costa M.S., Rooney A.P., Yi H., Xu X.W., De Meyer S., Trujillo M.E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2018. – V. 68. – Iss. 1. – P. 461–466.
60. Cihan A.C., Koc M., Ozcan B., Tekin N., Cokmus C. *Thermolongibacillus altinsuensis* gen. nov., sp. nov. and *Thermolongibacillus kozakliensis* sp. nov., aerobic, thermophilic, long bacilli isolated from hot springs // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2014. – V. 64. – Iss. Pt_1. – P. 187–197.
61. Daffonchio D., Borin S., Brusa T., Brusetti L., van der Wielen P.W., Bolhuis H., Yakimov M.M., D'Auria G., Giuliano L., Marty D., Tamburini C., McGenity T.J., Hallsworth J.E., Sass A.M., Timmis K.N., Tselepides A., de Lange G.J., Hübner A., Thomson J., Varnavas S.P., Gasparoni F., Gerber H.W., Malinverno E., Corselli C., Garcin J., McKew B., Golyshin P.N., Lampadariou N., Polymenakou P., Calore D., Cenedese S., Zanon F., Hoog S. Stratified prokaryote network in the oxic-anoxic transition of a deep-sea halocline // *Nature*. – 2006. – V. 440. – № 7081. – P. 203–207.
62. Dhakar K., Pandey A. Wide pH range tolerance in extremophiles: towards understanding an important phenomenon for future biotechnology // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2016. – V. 100. – № 6. – P. 2499–2510.
63. Dhaker A.S., Marwah R., Damodar R., Gupta D., Gautam H.K., Sultana S., Arora R. In vitro evaluation of antioxidant and radioprotective properties of a novel extremophile from mud volcano: implications for management of radiation emergencies // *Mol Cell Biochem*. – 2011. – V. 353. – № 1–2. – P. 243–250.
64. Dimitrov L.I. Mud volcanoes — the most important pathway for degassing deeply buried sediments // *Earth-Science Reviews*. – 2002. – V. 59. – № 1. – P. 49–76.
65. Dou G., Liu H., He W., Ma Y. *Bacillus lindianensis* sp. nov., a novel alkaliphilic and moderately halotolerant bacterium isolated from saline and alkaline soils // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2016. – V. 109. – № 1. – P. 149–158.
66. Etiopie G., Klusman R.W. Geologic emissions of methane to the atmosphere // *Chemosphere*. – 2002. – V. 49. – № 8. – P. 777–789.
67. Fichtel K., Mathes F., Könneke M., Cypionka H., Engelen B. Isolation of sulfate-reducing bacteria from sediments above the deep-subseafloor aquifer // *Front Microbiol*. – 2012. – V. 3. – article 65. doi: 10.3389/fmicb.2012.00065.

68. Finster K., Liesack W., Tindall B.J. *Sulfurospirillum arcachonense* sp. nov., a new microaerophilic sulfur-reducing bacterium // Int J Syst Bacteriol. – 1997. – V. 47. – № 4. – P. 1212–1217.
69. Frolova A.A., Merkel A.Yu., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Anaerotalea alkaliphila* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, anaerobic, fermentative bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // Extremophiles. – 2021a. – V. 25. – P. 301–309 65.
70. Frolova A.A., Merkel A.Yu., Kuchierskaya A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. (2021b) *Pseudodesulfovibrio alkaliphilus* sp. nov., an alkaliphilic sulfate-reducing bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // Antonie van Leeuwenhoek. – 2021b. – V. 114. – P. 1387–1397.
71. Frolova A.A., Merkel A.Yu., Kopitsyn D.S., Slobodkin A.I. *Petrocella pelovolcani* sp. nov., an alkaliphilic anaerobic bacterium isolated from terrestrial mud volcano // Microbiology (Moscow). – 2024. – V. 93. – № 4. – P. 391-398.
72. Garnova E.S. Zhilina T.N., Tourova T.P., Lysenko A.M. *Anoxynatronum sibiricum* gen. nov., sp. nov. alkaliphilic saccharolytic anaerobe from cellulolytic community of Nizhnee Beloe (Transbaikal region) // Extremophiles. – 2003. – V. 7. – № 3. – P. 213–220.
73. Garnova E.S., Zhilina T.N., Tourova T.P., Kostrikin N.A., Zavarzin G.A. Anaerobic, alkaliphilic, saccharolytic bacterium *Alkalibacter saccharofermentans* gen. nov., sp. nov. from a soda lake in the Transbaikal region of Russia // Extremophiles. – 2004. – V. 8. – № 4. – P. 309–316.
74. Ghiasian M., Akhavan Sepahy A., Amoozegar M.A., Saadatmand S., Shavandi M. Bacterial diversity determination using culture-dependent and culture-independent methods // Global Journal of Environmental Science and Management. – 2017. – V. 3 – P.153–164.
75. Ghosh W., Dam B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea // FEMS Microbiol Rev. – 2009. – V. 33. – № 6. – P. 999–1043.
76. Gilmour C.C., Soren A.B., Gionfriddo C.M., Podar M., Wall J.D., Brown S.D., Michener J.K., Urriza M.S.G., Elias D.A. *Pseudodesulfovibrio mercurii* sp. nov., a mercury-methylating bacterium isolated from sediment // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2019. – V. 71. – № 3. article 004697. doi: 10.1099/ijsem.0.004697.
77. Goris J., Konstantinidis K.T., Klappenbach J.A., Coenye T., Vandamme P., Tiedje J.M. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2007. – V. 57. – Iss. Pt 1. – P. 81–91.

78. Goris T., Schubert T., Gadkari J., Wubet T., Tarkka M., Buscot F., Adrian L., Diekert G. Insights into organohalide respiration and the versatile catabolism of *Sulfurospirillum multivorans* gained from comparative genomics and physiological studies // *Environ Microbiol.* – 2014. – V. 16. – № 11. – P. 3562–3580.
79. Grabowski A., Nercessian O., Fayolle F., Blanchet D., Jeanthon C. Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2005. – V. 54. – № 3. – P. 427–443.
80. Green-Saxena A., Feyzullayev A., Hubert C.R. Kallmeyer J., Krueger M., Sauer P., Schulz H.M., Orphan V.J. Active sulfur cycling by diverse mesophilic and thermophilic microorganisms in terrestrial mud volcanoes of Azerbaijan // *Environmental Microbiology.* – 2012. – V. 14. – № 12. – P. 3271–3286.
81. Groth I., Schumann P., Rajney F.A., Martin K., Schuetze B., Augsten K. *Bogoriella caseilytica* gen. nov., sp. nov., a new alkaliphilic actinomycete from a soda lake in Africa // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 1997. – V. 47. – Iss. 3. – P. 788–794.
82. Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0 // *Syst Biol.* – 2010. – V. 59. – № 3. – P. 307–321.
83. Gupta R., Beg Q. K., Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2002. – V. 59. – № 1. – P. 15–32.
84. Hazkani-Covo E., Graur D. Evolutionary conservation of bacterial operons: does transcriptional connectivity matter? // *Genetica.* – 2005. – V. 124. – № 2–3. – P. 145–166.
85. Hirota K., Hanaoka Y., Nodasaka Y., Yumoto I. *Gracilibacillus alcaliphilus* sp. nov., a facultative alkaliphile isolated from indigo fermentation liquor for dyeing // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2014. – V. 64. – Iss. Pt_9. – P. 3174–3180.
86. Hirota K., Okamoto T., Matsuyama H., Yumoto I. *Polygonibacillus indicireducens* gen. nov., sp. nov., an indigo-reducing and obligate alkaliphile isolated from indigo fermentation liquor for dyeing // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2016. – V. 66. – Iss. 11. – P. 4650–4656.
87. Hirota K., Nishita M., Matsuyama H., Yumoto I. *Paralkalibacillus indicireducens* gen., nov., sp. nov., an indigo-reducing obligate alkaliphile isolated from indigo fermentation liquor used for dyeing // *International Journal of*

- Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2017. – V. 67. – Iss. 10. – P. 4050–4056.
88. Hirota K., Aino K., Yumoto I. *Fermentibacillus polygoni* gen. nov., sp. nov., an alkaliphile that reduces indigo dye // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2016. – V. 66. – Iss. 6. – P. 2247–2253.
89. Hoefl S.E., Blum J.S., Stolz J.F., Tabita F.R., Witte B., King G.M., Santini J.M., Oremland R.S. *Alkalilimnicola ehrlichii* sp. nov., a novel, arsenite-oxidizing haloalkaliphilic gammaproteobacterium capable of chemoautotrophic or heterotrophic growth with nitrate or oxygen as the electron acceptor // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2007. – V. 57. – Iss. Pt 3. – P. 504–512.
90. Horikoshi K. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology // Microbiol Mol Biol Rev. – 1999. – V. 63. – № 4. – P. 735–750.
91. Horikoshi K. Alkaliphiles // Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. – 2004. – V. 80. – № 4. – P. 166–178.
92. Horikoshi K. General Physiology of Alkaliphiles // Extremophiles Handbook / под ред. K. Horikoshi. Tokyo: Springer Japan. – 2011. – С. 99–118.
93. Hosoya S., Suzuki S., Adachi K., Matsuda S., Kasai H. *Paramoritella alkaliphila* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Moritellaceae* isolated in the Republic of Palau // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2009. – V. 59. – Iss. 2. – P. 411–416.
94. Hsu H.-C., Chen J.S., Nagarajan V., Hussain B., Huang S.W., Rathod J., Hsu B.M. Assessment of temporal effects of a mud volcanic eruption on the bacterial community and their predicted metabolic functions in the mud volcanic sites of Niaosong, Southern Taiwan // Microorganisms. – 2021. – V. 9. – № 11. – article 2315. doi: 10.3390/microorganisms9112315.
95. Hyatt D., Chen G.L., Locascio P.F., Land M.L., Larimer F.W., Hauser L.J. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification // BMC Bioinformatics. – 2010. – V. 11. – article 119. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/11/119>.
96. Ishikawa M., Nakajima K., Ishizaki S., Kodama K., Okamoto-Kainuma A., Koizumi Y., Yamamoto Y., Yamasato K. *Alkalibacterium subtropicum* sp. nov., a slightly halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from decaying marine algae // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2011. – V. 61. – Iss. Pt 12. – P. 2996–3002.

97. Ito S. Alkaline cellulases from alkaliphilic *Bacillus*: enzymatic properties, genetics, and application to detergents // *Extremophiles*. – 1997. – V. 1. – № 2. – P. 61–66.
98. Ivanov M.K., Limonov A.F., Weering Tj.C.E. van. Comparative characteristics of the Black Sea and Mediterranean Ridge mud volcanoes // *Marine Geology*. – 1996. – V. 132. – № 1. – P. 253–271.
99. Jang J.-Y., Oh Y.J., Lim S.K., Park H.K., Lee C., Kim J.Y., Lee M.-A., Choi H.-J. *Salicibacter kimchii* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic and alkalitolerant bacterium in the family *Bacillaceae*, isolated from kimchi // *J Microbiol*. – 2018. – V. 56. – № 12. – P. 880–885.
100. Jones B.E., Grant W.D. Microbial Diversity and Ecology of Alkaline Environments // *Journey to Diverse Microbial Worlds* / Ed.: J. Seckbach. Dordrecht: Springer Netherlands. – 2000. – C. 177–190.
101. Joshi A. Thite S., Karodi P., Joseph N., Lodha T. *Alkalihalobacterium elongatum* gen. nov., sp. nov.: an antibiotic-producing bacterium isolated from Lonar Lake and reclassification of the genus *Alkalihalobacillus* into seven novel genera // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – V. 12. article 722369. doi: 10.3389/fmicb.2021.722369.
102. Kageyama A., Haga T., Kasai H., Shizuri Y., Omura S., Takahashi Y.. *Marihabitans asiaticum* gen. nov., sp. nov., a meso-diaminopimelic acid-containing member of the family *Intrasporangiaceae* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2008. – V. 58. – Iss. 10. – P. 2429–2432.
103. Kalwasińska A., Felföldi T., Szabó A., Deja-Sikora E., Kosobucki P., Walczak M. Microbial communities associated with the anthropogenic, highly alkaline environment of a saline soda lime, Poland // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2017. – V. 110. – № 7. – P. 945–962.
104. Kather B., Stingl K., van der Rest M.E., Altendorf K., Molenaar D. Another unusual type of citric acid cycle enzyme in *Helicobacter pylori*: the malate:quinone oxidoreductase // *J Bacteriol*. – 2000. – V. 182. – № 11. – P. 3204–3209.
105. Kenyon N.H., Akhmetzhanov A., Nielsen T., Kuijpers A., Ivanov M., Shashkin P. Sandy contourites and pathways of the Norwegian Sea overflow water, West of the Faeroe Bank Channel // *European Margin Sediment Dynamics: Side-Scan Sonar and Seismic Images* / Ed.: J. Mienert, P. Weaver. Berlin, Heidelberg: Springer, 2003. – C. 153–157.
106. Kenyon N.H., Ivanov M. K., Akhmetzhanov A.M. Cold water carbonate mounds and sediment transport on the northeast atlantic margin - preliminary

results of geological and geophysical investigations during the TTR-7 cruise of R/V Professor Logachev in co-operation with the CORSAIRES and ENAM 2 programmes. July-August, 1997. UNESCO 1998.
https://epic.awi.de/id/eprint/44545/1/TTR-7_cr.pdf

107. Keshri J., Mishra A., Jha B. Microbial population index and community structure in saline-alkaline soil using gene targeted metagenomics // *Microbiol Res.* – 2013. – V. 168. – № 3. – P. 165–173.

108. Kevbrin V., Boltyanskaya Y., Grouzdev D., Koziyeva V., Park M., Cho J.C. *Natronospirillum operosum* gen. nov., sp. nov., a haloalkaliphilic satellite isolated from decaying biomass of a laboratory culture of cyanobacterium *Geitlerinema* sp. and proposal of *Natronospirillaceae* fam. nov., *Saccharospirillaceae* fam. nov. and *Gynuellaceae* fam. nov // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2020. – V. 70. – Iss. 1. – P. 511–521.

109. Kevbrin V.V. Isolation and cultivation of alkaliphiles // *Adv Biochem Eng Biotechnol.* – 2020. – V. 172. – P. 53–84.

110. Khan S., Ivey D.M., Krulwich T.A. Membrane ultrastructure of alkaliphilic *Bacillus* species studied by rapid-freeze electron microscopy // *J Bacteriol.* – 1992. – V. 174. – № 15. – P. 5123–5126.

111. Khelaifia S., Fardeau M.L., Pradel N., Aussignargues C., Garel M., Tamburini C., Cayol J.L., Gaudron S., Gaill F., Ollivier B. *Desulfovibrio piezophilus* sp. nov., a piezophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from wood falls in the Mediterranean Sea // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2011. – V. 61. – Iss. Pt 11. – P. 2706–2711.

112. Khlystov O.M., Poort J., Mazzini A., Akhmanov G.G., Minami H., Hachikubo A., Khabuev A.V., Kazakov A.V., De Batist M., Naudts L., Chensky A.G., Vorobeva S.S. Shallow-rooted mud volcanism in Lake Baikal // *Marine and Petroleum Geology.* – 2019. – V. 102. – P. 580–589.

113. Khomyakova M.A., Merkel A.Y., Kopitsyn D.S., Slobodkin A.I. *Pelovirga terrestris* gen. nov., sp. nov., anaerobic, alkaliphilic, fumarate-, arsenate-, Fe(III)- and sulfur-reducing bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // *Systematic and Applied Microbiology.* – 2022. V. 45. – № 2. – article 126304. doi: 10.1016/j.syapm.2022.126304.

114. Khomyakova M.A., Merkel A.Y., Segliuk V.S., Slobodkin A.I. *Desulfatitalea alkaliphila* sp. nov., an alkaliphilic sulfate- and arsenate- reducing bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // *Extremophiles.* – 2023. – V. 27. – № 2. – article 12. doi: 10.1007/s00792-023-01297-0.

115. Khomyakova M.A., Merkel A. Y., Slobodkin A. I. *Perlabentimonas gracilis* gen. nov., sp. nov., a gliding aerotolerant anaerobe of the order Bacteroidales,

isolated from a terrestrial mud volcano // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2021. – V. 44. – № 5. – article 126245. doi: 10.1016/j.syapm.2021.126245.

116. Kim Y.-G., Choi D.H, Hyun S., Cho B.C. *Oceanobacillus profundus* sp. nov., isolated from a deep-sea sediment core // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2007. – V. 57. – Iss. Pt 2. – P. 409–413.

117. Kmomyakova M.A., Merkel A.Y., Petrova D.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Alkalibaculum sporogenes* sp. nov., isolated from a terrestrial mud volcano and emended description of the genus *Alkalibaculum* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2020. – V. 70. – Iss. 9. – P. 4914–4919.

118. Kobayashi H., Endo K., Sakata S., Mayumi D., Kawaguchi H., Ikarashi M., Miyagawa Y., Maeda H., Sato K. Phylogenetic diversity of microbial communities associated with the crude-oil, large-insoluble-particle and formation-water components of the reservoir fluid from a non-flooded high-temperature petroleum reservoir // *J Biosci Bioeng*. – 2012. – V. 113. – № 2. – P. 204–210.

119. Kodama Y., Ha L. T., Watanabe K. *Sulfurospirillum cavolei* sp. nov., a facultatively anaerobic sulfur-reducing bacterium isolated from an underground crude oil storage cavity // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2007. – V. 57. – Iss. Pt 4. – P. 827–831.

120. Kokoschka S., Dreier A., Romoth K., Taviani M., Schafer N., Reitner J., Hoppert M. Isolation of anaerobic bacteria from terrestrial mud volcanoes (Salse di Nirano, Northern Apennines, Italy) // *Geomicrobiology Journal*. – 2015. – V. 32. – № 3–4. – P. 355–364.

121. Konstantinidis K.T., Rosselló-Móra R., Amann R. Uncultivated microbes in need of their own taxonomy // *ISME J*. – 2017. – V. 11. – № 11. – P. 2399–2406.

122. Konstantinidis K.T., Tiedje J.M. Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2004. – V. 101. – № 9. – P. 3160–3165.

123. Krishna P., Babu A.G., Reddy M.S. Bacterial diversity of extremely alkaline bauxite residue site of alumina industrial plant using culturable bacteria and residue 16S rRNA gene clones // *Extremophiles*. – 2014. – V. 18. – № 4. – P. 665–676.

124. Krulwich T.A., Guffanti A.A. Alkalophilic bacteria // *Annu Rev Microbiol*. – 1989. – V. 43. – P. 435–463.

125. Kudaeva A.A., Kudaev A.A., Akhmanov G.G., Vidischeva O.N., Solovyeva M.A., Khlystov O.M. Composition and structure of mud volcanic deposits in Lake

Baikal: the Class@Baikal Project data report // Limnology and Freshwater Biology. – 2020. – P. 931–932.

126. Kuever J., Rainey F.A., Widdel F. *Desulfobacterales* ord. nov // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Ltd, 2015. – P. 1–2. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.obm00084>.

127. Kukolya J., Bata-Vidács I., Luzics S., Tóth E., Kéki Z., Schumann P., Táncsics A., Nagy I., Olasz F., Tóth Á. *Xylanibacillus composti* gen. nov., sp. nov., isolated from compost // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2018. – V. 68. – Iss. 3. – P. 698–702.

128. Kumar P.A., Srinivas T.N.R., Manasa P., Madhu S., Shivaji S. *Lutibaculum baratangense* gen. nov., sp. nov., a proteobacterium isolated from a mud volcano // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2012. – V. 62. – Iss. Pt_8. – P. 2025–2031.

129. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // Mol Biol Evol. – 2016. – V. 33. – № 7. – P. 1870–1874.

130. Lakhal R., Pradel N., Postec A., Hamdi M., Ollivier B., Godfroy A., Fardeau M.L. *Vallitalea guaymasensis* gen. nov., sp. nov., isolated from marine sediment // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2013. – V. 63. – Iss. Pt 8. – P. 3019–3023.

131. Lee E.M., Jeon C.O., Choi I., Chang K.S., Kim C.J. *Silanimonas lenta* gen. nov., sp. nov., a slightly thermophilic and alkaliphilic gammaproteobacterium isolated from a hot spring // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2005. – V. 55. – Iss. Pt 1. – P. 385–389.

132. Lee K., Choo Y.J., Giovannoni S.J., Cho J.C. *Maritimibacter alkaliphilus* gen. nov., sp. nov., a genome-sequenced marine bacterium of the Roseobacter clade in the order Rhodobacterales // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2007. – V. 57. – Iss. 7. – P. 1653–1658.

133. Li J., Long L.J., Yang L.L., Xu Y., Wang F.Z., Li Q.X., Zhang S., Li W.J. *Janibacter alkaliphilus* sp. nov., isolated from coral Anthogorgia sp // Antonie van Leeuwenhoek. – 2012. – V. 102. – № 1. – P. 157–162.

134. Limonov A.F., Woodside J.M., Cita M.B., Ivanov M.K. The Mediterranean Ridge and related mud diapirism: a background // Marine Geology. – 1996. – V. 132. – № 1. – P. 7–19.

135. Lin Y.-T., Tu T.H., Wei C.L., Rumble D., Lin L.H., Wang P.L. Steep redox gradient and biogeochemical cycling driven by deeply sourced fluids and gases in

a terrestrial mud volcano // FEMS Microbiol Ecol. – 2018. – V. 94. – № 11. article fiy171. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy171>.

136. Luijten M.L.G.C., de Weert J., Smidt H., Boschker H.T.S., de Vos W.M., Schraa G., Stams A.J.M. Description of *Sulfurospirillum halorespirans* sp. nov., an anaerobic, tetrachloroethene-respiring bacterium, and transfer of *Dehalospirillum multivorans* to the genus *Sulfurospirillum* as *Sulfurospirillum multivorans* comb. nov // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2003. – V. 53. – Iss. Pt 3. – P. 787–793.

137. Lumppio H.L., Shenvi N.V., Summers A.O., Voordouw G., Kurtz D.M. Jr. Rubrerythrin and rubredoxin oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgaris*: a novel oxidative stress protection system // J Bacteriol. – 2001. – V. 183. – № 1. – P. 101–108.

138. Malasarn D., Keeffe J.R., Newman D.K. Characterization of the arsenate respiratory reductase from *Shewanella* sp. strain ANA-3 // J Bacteriol. – 2008. – V. 190. – № 1. – P. 135–142.

139. Mall A., Sobotta J., Huber C., Tschirner C., Kowarschik S., Bačnik K., Mergelsberg M., Boll M., Hügler M. Eisenreich W., Berg I.A. Reversibility of citrate synthase allows autotrophic growth of a thermophilic bacterium // Science. – 2018. – V. 359. – № 6375. – P. 563–567.

140. Manna S.K., Das B.K., Mohanty B.P., Bandopadhyay C., Das N., Baitha R., Das A.K. Exploration of heterotrophic bacterial diversity in sediments of the mud volcano in the Andaman and Nicobar Islands, India // Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management. – 2021. – V. 16. – article 100465. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100465>.

141. Mardanov A.V., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Ravin N.V. Sulfur and methane-oxidizing microbial community in a terrestrial mud volcano revealed by metagenomics // Microorganisms. – 2020. – V. 8. – № 9. – article 1333. doi: 10.3390/microorganisms8091333.

142. Martinelli G., Cremonini S., Samonati E. Geological and Geochemical Setting of Natural Hydrocarbon Emissions in Italy // Advances in Natural Gas Technology. IntechOpen, 2012. doi: 10.5772/37446.

143. Mazzini A., Etiope G. Mud volcanism: An updated review // Earth-Science Reviews. – 2017. – V. 168. – P. 81–112.

144. Mei N., Postec A., Erauso G., Joseph M., Pelletier B., Payri C., Ollivier B., Québécois M. *Serpentinicella alkaliphila* gen. nov., sp. nov., a novel alkaliphilic anaerobic bacterium isolated from the serpentinite-hosted Prony hydrothermal field, New Caledonia // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2016. – V. 66. – Iss. 11. – P. 4464–4470.

145. Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // *BMC Bioinformatics*. – 2013. – V. 14. – article 60. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/14/60>.
146. Merkel A.Y., Chernyh N.A., Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. Diversity and metabolic potential of the terrestrial mud volcano microbial community with a high abundance of archaea mediating the anaerobic oxidation of methane // *Life*. – 2021. – V. 11. – № 9. – article 953. doi: 10.3390/life11090953.
147. Mesbah N.M., Hedrick D.B., Peacock A.D., Rohde M., Wiegel J. *Natranaerobius thermophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic, alkalithermophilic bacterium from soda lakes of the Wadi An Natrun, Egypt, and proposal of *Natranaerobiaceae* fam. nov. and *Natranaerobiales* ord. nov // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2007. – V. 57. – Iss. Pt 11. – P. 2507–2512.
148. Mesbah N.M., Wiegel J. *Natronovirga wadinatrunensis* gen. nov., sp. nov. and *Natranaerobius trueperi* sp. nov., halophilic, alkalithermophilic microorganisms from soda lakes of the Wadi An Natrun, Egypt // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2009. – V. 59. – Iss. 8. – P. 2042–2048.
149. Milkov A.V. Worldwide distribution of submarine mud volcanoes and associated gas hydrates // *Marine Geology*. – 2000. – V. 167. – № 1. – P. 29–42.
150. Miyake N., Ishimaru R., Komatsu G., Matsui T. Characterization of archaeal and bacterial communities thriving in methane-seeping on-land mud volcanoes, Niigata, Japan // *Int Microbiol*. – 2023. – V. 26. – № 2. – P. 191–204.
151. Mori K., Kim H., Kakegawa T., Hanada S. A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: *Thermodesulfobiaceae* fam. nov., *Thermodesulfobium narugense* gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolate from a hot spring // *Extremophiles*. – 2003. – V. 7. – № 4. – P. 283–290.
152. Motamedi M., Pedersen K. *Desulfovibrio aespoeensis* sp. nov., a mesophilic sulfate-reducing bacterium from deep groundwater at Aspö hard rock laboratory, Sweden // *Int J Syst Bacteriol*. – 1998. – V. 48 – Pt 1. – P. 311–315.
153. Muyzer G., Teske A., Wirsén C.O., Jannasch H.W. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments // *Arch Microbiol*. – 1995. – V. 164. – № 3. – P. 165–172.
154. Muyzer G., Waal E. C. de, Uitterlinden A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase

chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA // *Appl Environ Microbiol.* – 1993. – V. 59. – № 3. – P. 695–700.

155. Nakamura T., Yamada K.D., Tomii K., Katoh K. Parallelization of MAFFT for large-scale multiple sequence alignments // *Bioinformatics.* – 2018. – V. 34. – № 14. – P. 2490–2492.

156. Niemann H., Lösekann T., de Beer D., Elvert M., Nadalig T., Knittel K., Amann R., Sauter E.J., Schlüter M., Klages M., Foucher J.P., Boetius A. Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink // *Nature.* – 2006. – V. 443. – № 7113. – P. 854–858.

157. Ntougias S., Russell N.J. *Alkalibacterium olivoapovliticus* gen. nov., sp. nov., a new obligately alkaliphilic bacterium isolated from edible-olive wash-waters. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2001. – V. 51. – Iss. 3. – P. 1161–1170.

158. Nunoura T., Chikaraishi Y., Izaki R., Suwa T., Sato T., Harada T., Mori K., Kato Y., Miyazaki M., Shimamura S., Yanagawa K., Shuto A., Ohkouchi N., Fujita N., Takaki Y., Atomi H., Takai K. A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile // *Science.* – 2018. – V. 359. – № 6375. – P. 559–563.

159. Oren A. Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations // *Environ Microbiol.* – 2011. – V. 13. – № 8. – P. 1908–1923.

160. Overbeek R., Olson R., Pusch G.D., Olsen G.J., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Gerdes S., Parrello B., Shukla M., Vonstein V., Wattam A.R., Xia F., Stevens R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST) // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – V. 42. – № Database issue. C. D206-214.

161. Parks D.H., Chuvochina M., Rinke C., Mussig A.J., Chaumeil P.A., Hugenholtz P. GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy // *Nucleic Acids Res.* – 2022. – V. 50. – № D1. – P. D785–D794.

162. Pedersen K., Bengtsson A., Edlund J., Rabe L., Hazen T., Chakraborty R., Goodwin L., Shapiro N. Complete genome sequence of the subsurface, mesophilic sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio aespoeensis* Aspö-2 // *Genome Announc.* – 2014. – V. 2. – № 3. – article e00509-14. doi: 10.1128/genomeA.00509-14.

163. Pereira I.A.C., Ramos A.R., Grein F., Marques M.C., da Silva S.M., Venceslau S.S. A comparative genomic analysis of energy metabolism in sulfate reducing bacteria and archaea // *Front Microbiol.* – 2011. – V. 2. – article 69. doi: 10.3389/fmicb.2011.00069.

164. Pérez Bernal M.F., Souza Brito E.M., Bartoli M., Aubé J., Fardeau M.L., Cuevas Rodriguez G., Ollivier B., Guyoneaud R., Hirschler-Réa A. *Desulfonatronum parangueonense* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from sediment of an alkaline crater lake // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2017. – V. 67. – Iss. 12. – P. 4999–5005.
165. Pérez-Bernal M.F., Brito E.M.S., Bartoli M., Aubé J., Ollivier B., Guyoneaud R., Hirschler-Réa A. *Desulfobotulus mexicanus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from the sediment of an alkaline crater lake in Mexico // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2020. – V. 70. – Iss. 5. – P. 3219–3225.
166. Pfennig N. Anveicherungskulturen für Rote und Grüne Schwefelbakterium // *Z. Bakteriol. Hyg. I Abt.* — 1965. — Suppl. 1 — P. 179-189.
167. Pikuta E., Lysenko A., Suzina N., Osipov G., Kuznetsov B., Tourova T., Akimenko V., Laurinavichius K. *Desulfotomaculum alkaliphilum* sp. nov., a new alkaliphilic, moderately thermophilic, sulfate-reducing bacterium // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2000a. – V. 50. – Iss. Pt 1. – P. 25–33.
168. Pikuta E., Lysenko A., Chuvilskaya N., Mendrock U., Hippe H., Suzina N., Nikitin D., Osipov G., Laurinavichius K. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavitherms* comb. nov // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2000b. – V. 50 – Iss. Pt 6. – C. 2109–2117.
169. Pikuta E.V., Hoover R.B., Bej A.K., Marsic D., Whitman W.B., Cleland D., Krader P. *Desulfonatronum thiodismutans* sp. nov., a novel alkaliphilic, sulfate-reducing bacterium capable of lithoautotrophic growth // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2003. – V. 53. – Iss. Pt 5. – P. 1327–1332.
170. Preiss L., Hicks D.B., Suzuki S., Meier T., Krulwich T.A. Alkaliphilic bacteria with impact on industrial applications, concepts of early life forms, and bioenergetics of ATP synthesis // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2015. – V. 3. – article 75. doi: 10.3389/fbioe.2015.00075.
171. Quéméneur M., Erauso G., Frouin E., Zeghal E., Vandecasteele C., Ollivier B., Tamburini C., Garel M., Ménez B., Postec A. Hydrostatic pressure helps to cultivate an original anaerobic bacterium from the Atlantis massif seafloor (IODP Expedition 357): *Petrocella atlantisensis* gen. nov., sp. nov // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – V. 10. – article 1497. doi: 10.3389/fmicb.2019.01497.

172. Quéméneur M., Erauso G., Bartoli M., Vandecasteele C., Wils L., Gil L., Monnin C., Pelletier B., Postec A. *Alkalicella caledoniensis* gen. nov., sp. nov., a novel alkaliphilic anaerobic bacterium isolated from «La Crouen» alkaline thermal spring, New Caledonia // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2021. – V. 71. – № 5. article 004810. doi: 10.1099/ijsem.0.004810.
173. Raghoebarsing A.A., Pol A., van de Pas-Schoonen K.T., Smolders A.J., Ettwig K.F., Rijpstra W.I., Schouten S., Damsté J.S., Op den Camp H.J., Jetten M.S., Strous M. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification // *Nature*. – 2006. – V. 440. – № 7086. – P. 918–921.
174. Ranchou-Peyruse M., Goñi-Urriza M., Guignard M., Goas M., Ranchou-Peyruse A., Guyoneaud R. *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* sp. nov., a mercury-methylating bacterium isolated from a brackish sediment // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2018. – V. 68. – Iss. 5. – P. 1461–1466.
175. Ratnikova N.M., Slobodkin A.I., Merkel A.Y., Kopitsyn D.S., Kevbrin V.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkina G.B. *Sulfurimonas crateris* sp. nov., a facultative anaerobic sulfur-oxidizing chemolithoautotrophic bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2020. – V. 70. – Iss. 1. – P. 487–492.
176. Rauschenbach I., Narasingarao P., Häggblom M. M. *Desulfurispirillum indicum* sp. nov., a selenate- and selenite-respiring bacterium isolated from an estuarine canal // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2011. – V. 61. – Iss. 3. – P. 654–658.
177. Remizovschi A., Carpa R., Forray F.L., Chiriac C., Roba C.A., Beldean-Galea S., Andrei A.Ş., Szekeres E., Baricz A., Lupan I., Rudi K., Coman C. Mud volcanoes and the presence of PAHs // *Sci Rep*. – 2020. – V. 10. – № 1. – article 1253. doi: 10.1038/s41598-020-58282-2.
178. Ren G., Ma A., Zhang Y., Deng Y., Zheng G., Zhuang X., Zhuang G., Fortin D.. Electron acceptors for anaerobic oxidation of methane drive microbial community structure and diversity in mud volcanoes // *Environ Microbiol*. – 2018. – V. 20. – № 7. – P. 2370–2385.
179. Richter M., Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2009. – V. 106. – № 45. – P. 19126–19131.
180. Roadcap G.S., Sanford R.A., Jin Q., Pardinas J.R., Bethke C.M. Extremely alkaline (pH > 12) ground water hosts diverse microbial community // *Ground Water*. – 2006. – V. 44. – № 4. – P. 511–517.

181. Rodriguez-R L.M., Konstantinidis K.T. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes // PeerJ. – 2016. – V. 4. – article e1900v1. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.1900v1>.
182. Romano I., Finore I., Nicolaus G., Huertas F.J., Lama L., Nicolaus B., Poli A. *Halobacillus alkaliphilus* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a salt lake in Fuente de Piedra, southern Spain // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2008. – V. 58. – Iss. 4. – P. 886–890.
183. Ross D.E., Marshall C.W., May H.D., Norman R.S. Comparative genomic analysis of *Sulfurospirillum cavolei* MES reconstructed from the metagenome of an electrosynthetic microbiome // PLoS One. – 2016. – V. 11. – № 3. – article e0151214. doi: 10.1371/journal.pone.0151214.
184. 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. – № 5. – P. 851–859.
185. Sánchez-Andrea I., Guedes I.A., Hornung B, Boeren S., Lawson C.E., Sousa D.Z., Bar-Even A., Claassens N.J., Stams A.J.M. The reductive glycine pathway allows autotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans* // Nat Commun. – 2020. – V. 11. – № 1. – article 5090. doi: 10.1038/s41467-020-18906-7.
186. Sarethy I.P., Saxena Y., Kapoor A., Sharma M., Sharma S.K., Gupta V., Gupta S. Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology // J Ind Microbiol Biotechnol. – 2011. – V. 38. – № 7. – P. 769–790.
187. Sasi Jyothsna T.S., Sasikala C., Ramana C. V. *Desulfovibrio psychrotolerans* sp. nov., a psychrotolerant and moderately alkaliphilic sulfate-reducing deltaproteobacterium from the Himalayas // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2008. – V. 58. – Iss. Pt 4. – P. 821–825.
188. Schmidt M., Priemé A., Johansen A., Stougaard P. *Alkalilactibacillus ikkensis*, gen. nov., sp. nov., a novel enzyme-producing bacterium from a cold and alkaline environment in Greenland // Extremophiles. – 2012. – V. 16. – № 2. – P. 297–305.
189. Schmidt M., Priemé A., Stougaard P. *Rhodonellum psychrophilum* gen. nov., sp. nov., a novel psychrophilic and alkaliphilic bacterium of the phylum Bacteroidetes isolated from Greenland // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2006a. – V. 56. – Iss 12. – P. 2887–2892.
190. Schmidt M., Priemé A., Stougaard P. Bacterial diversity in permanently cold and alkaline ikaite columns from Greenland // Extremophiles. – 2006b. – V. 10. – № 6. – P. 551–562.

191. Schmidt M., Priemé A., Stougaard P. *Arsukibacterium ikkense* gen. nov., sp. nov, a novel alkaliphilic, enzyme-producing γ -Proteobacterium isolated from a cold and alkaline environment in Greenland // Systematic and Applied Microbiology. – 2007. – V. 30. – № 3. – P. 197–201.
192. Schulze-Makuch D., Haque S., Beckles D., Schmitt-Kopplin P., Harir M., Schneider B., Stumpp C., Wagner D. A chemical and microbial characterization of selected mud volcanoes in Trinidad reveals pathogens introduced by surface water and rain water // Sci Total Environ. – 2020. – V. 707. – article 136087. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.136087.
193. Sekar R., Mills D.K., Remily E.R., Voss J.D., Richardson L.L. Microbial communities in the surface mucopolysaccharide layer and the black band microbial mat of black band-diseased *Siderastrea siderea* // Appl Environ Microbiol. – 2006. – V. 72. – № 9. – P. 5963–5973.
194. Sepanian E., Sepahy A.A., Hosseini F. Isolation and characterization of bacterial species from Ain Mud Volcano, Iran // Microbiology. – 2018. – V. 87. – № 2. – P. 282–289.
195. Simon J., Sanger M., Schuster S.C., Gross R. Electron transport to periplasmic nitrate reductase (NapA) of *Wolinella succinogenes* is independent of a NapC protein // Mol Microbiol. – 2003. – V. 49. – № 1. – P. 69–79.
196. Slobodkin A.I., Reysenbach A.L., Slobodkina G.B., Baslerov R.V., Kostrikin N.A., Wagner I.D., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Thermosulfurimonas dismutans* gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic sulfur-disproportionating bacterium from a deep-sea hydrothermal vent // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2012. – V. 62. – Iss. Pt_11. – P. 2565–2571.
197. Slobodkina G., Merkel A., Ratnikova N., Kuchierskaya A., Slobodkin A. *Sedimenticola hydrogenitrophicus* sp. nov. a chemolithoautotrophic bacterium isolated from a terrestrial mud volcano, and proposal of *Sedimenticolaceae* fam. nov. in the order *Chromatiales* // Systematic and Applied Microbiology. – 2023. – V. 46. – № 5. – article 126451. doi: 10.1016/j.syapm.2023.126451.
198. Slobodkina G.B., Panteleeva A.N., Kostrikin N.A., Kopitsyn D.S., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Tepidibacillus fermentans* gen. nov., sp. nov.: a moderately thermophilic anaerobic and microaerophilic bacterium from an underground gas storage // Extremophiles. – 2013. – V. 17. – № 5. – P. 833–839.
199. Slobodkina G.B., Merkel A.Y., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin AI. *Pelomicrobium methylotrophicum* gen. nov., sp. nov. a moderately thermophilic, facultatively anaerobic, lithoautotrophic and methylotrophic bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // Extremophiles. – 2020. – V. 24. – № 1. – P. 177-185.

200. Slobodkina G., Ratnikova N., Merkel A., Kevbrin V., Kuchierskaya A., Slobodkin A. Lithoautotrophic lifestyle of the widespread genus *Roseovarius* revealed by physiological and genomic characterization of *Roseovarius autotrophicus* sp. nov // FEMS Microbiology Ecology – 2022. – V. 98. – № 10. article fiac113. doi: 10.1093/femsec/fiac113.
201. Søndergaard D., Pedersen C.N.S. Greening C. HydDB: A web tool for hydrogenase classification and analysis // Sci Rep. – 2016. – V. 6. – article 34212. doi: 10.1038/srep34212.
202. Song Y., Lee J.S., Shin J., Lee G.M., Jin S., Kang S., Lee J.K., Kim D.R., Lee E.Y., Kim S.C., Cho S., Kim D., Cho B.K. Functional cooperation of the glycine synthase-reductase and Wood-Ljungdahl pathways for autotrophic growth of *Clostridium drakei* // Proc Natl Acad Sci USA. – 2020. – V. 117. – № 13. – P. 7516–7523.
203. Sorokin D.Y., Turova T.P., Kuznetsov B.B., Briantseva I.A., Gorlenko V.M. Culturable diversity of lithotrophic haloalkaliphilic sulfate-reducing bacteria in soda lakes and the description of *Desulfonatronum thioautotrophicum* sp. nov., *Desulfonatronum thiosulfatophilum* sp. nov., *Desulfonatronovibrio thiodismutans* sp. nov., and *Desulfonatronovibrio magnus* sp. nov // Extremophiles. – 2011a. – V. 15. – № 3. – P. 391–401.
204. Sorokin D.Y., Panteleeva A.N., Tourova T.P., Kaparullina E.N., Muyzer G. *Natronoflexus pectinivorans* gen. nov., sp. nov., an obligately anaerobic and alkaliphilic fermentative member of Bacteroidetes from soda lakes // Extremophiles. – 2011b. – V. 15. – № 6. – P. 691-696.
205. Sorokin D.Y., Tourova T.P., Panteleeva A.N., Kaparullina E.N., Muyzer G. Anaerobic utilization of pectinous substrates at extremely haloalkaline conditions by *Natranaerovirga pectinivora* gen. nov., sp. nov., and *Natranaerovirga hydrolytica* sp. nov., isolated from hypersaline soda lakes // Extremophiles. – 2012a. – V. 16. – № 2. – P. 307–315.
206. Sorokin D.Y., Tourova T.P., Panteleeva A.N., Muyzer G. *Desulfonatronobacter acidivorans* gen. nov., sp. nov. and *Desulfobulbus alkaliphilus* sp. nov., haloalkaliphilic heterotrophic sulfate-reducing bacteria from soda lakes // Isolation and characterization of bacterial species from Ain Mud Volcano, Iran. – 2012b. – V. 62. – Iss. Pt 9. – P. 2107–2113.
207. Sorokin D.Y., Gumerov V.M., Rakitin A.L., Beletsky A.V., Damsté J.S., Muyzer G., Mardanov A.V., Ravin N.V. Genome analysis of *Chitinivibrio alkaliphilus* gen. nov., sp. nov., a novel extremely haloalkaliphilic anaerobic

- chitinolytic bacterium from the candidate phylum Termite Group 3 // Environmental Microbiology. – 2014. – V. 16. – № 6. – P. 1549–1565.
208. Sorokin D.Y., Rakitin A.L., Gumerov V.M., Beletsky A.V., Sinninghe Damsté J.S., Mardanov A.V., Ravin N.V. Phenotypic and genomic properties of *Chitinispirillum alkaliphilum* gen. nov., sp. nov., a haloalkaliphilic anaerobic chitinolytic bacterium representing a novel class in the phylum *Fibrobacteres* // Frontiers in Microbiology. – 2016. – V. 7. – article 407. doi: 10.3389/fmicb.2016.00407.
209. Sorokin D.Y., Diender M., Merkel A.Y., Koenen M., Bale N.J., Pabst M., Sinninghe Damsté J.S., Sousa D.Z. *Natranaerofaba carboxydovora* gen. nov., sp. nov., an extremely haloalkaliphilic CO-utilizing acetogen from a hypersaline soda lake representing a novel deep phylogenetic lineage in the class 'Natranaerobiiia' // Environ Microbiol. – 2021. – V. 23. – № 7. – P. 3460–3476.
210. Sorokin D.Y., Chernyh N.A. *Desulfonatronospira sulfatiphila* sp. nov., and *Desulfitispora elongata* sp. nov., two novel haloalkaliphilic sulfidogenic bacteria from soda lakes // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2017. – V. 67. – Iss. 2. – P. 396–401.
211. Sorokin D.Y., Detkova E. N., Muyzer G. Propionate and butyrate dependent bacterial sulfate reduction at extremely haloalkaline conditions and description of *Desulfobotulus alkaliphilus* sp. nov. // Extremophiles. – 2010. – V. 14. – № 1. – P. 71–77.
212. Sorokin D.Y., Muyzer G. Haloalkaliphilic spore-forming sulfidogens from soda lake sediments and description of *Desulfitispora alkaliphila* gen. nov., sp. nov. // Extremophiles. – 2010. – V. 14. – № 3. – P. 313–320.
213. Sorokin D.Y., Pelt S. van, Tourova T.P. Utilization of aliphatic nitriles under haloalkaline conditions by *Bacillus alkalinitrilicus* sp. nov. isolated from soda solonchak soil // FEMS Microbiol Lett. – 2008. – V. 288. – № 2. – P. 235–240.
214. Sorokin D.Y., Tourova T.P., Muyzer G. Isolation and characterization of two novel alkalitolerant sulfidogens from a Thiopaq bioreactor, *Desulfonatronum alkalitolerans* sp. nov., and *Sulfurospirillum alkalitolerans* sp. nov // Extremophiles. – 2013. – V. 17. – № 3. – P. 535–543.
215. Sorokin D.Yu., Foti M., Tindall B.J., Muyzer G. *Desulfurispirillum alkaliphilum* gen. nov., sp. nov., a novel obligately anaerobic sulfur- and dissimilatory nitrate-reducing bacterium from a full-scale sulfide-removing bioreactor // Extremophiles. – 2007. – V. 11. – № 2. – P. 363–370.
216. Sorokin D.Yu., Tourova T.P., Musmann M., Muyzer G. *Dethiobacter alkaliphilus* gen. nov. sp. nov., and *Desulfurivibrio alkaliphilus* gen. nov., sp. nov.:

- two novel representatives of reductive sulfur cycle from soda lakes // *Extremophiles*. – 2008a. – V. 12. – № 3. – P. 431–439.
217. Sorokin I.D., Zadorina E.V., Kravchenko I.K., Boulygina E.S., Tourova T.P., Sorokin D.Y. *Natronobacillus azotifigens* gen. nov., sp. nov., an anaerobic diazotrophic haloalkaliphile from soda-rich habitats // *Extremophiles*. – 2008b. – V. 12. – № 6. – P. 819–827.
218. Spring S., Sorokin D.Y., Verbarq S., Rohde M, Woyke T., Kyrpides N.C. Sulfate-reducing bacteria that produce exopolymers thrive in the calcifying zone of a hypersaline cyanobacterial mat // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – V. 10. – article 862. doi: 10.3389/fmicb.2019.00862
219. Srinivas T.N.R., Anil Kumar P., Madhu S., Sunil B., Sharma T.V.R.S., Shivaji S. *Cesiribacter andamanensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a soil sample from a mud volcano // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2011. – V. 61. – Iss. Pt 7. – P. 1521–1527.
220. Srinivas T.N.R., Aditya S., Bhumika V., Kumar P.A. *Lunatimonas lonarensis* gen. nov., sp. nov., a haloalkaline bacterium of the family *Cyclobacteriaceae* with nitrate reducing activity // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2014. – V. 37. – № 1. – P. 10–16.
221. Srinivas T.N.R., Anil Kumar P., Tank M., Sunil B., Poorna M., Zareena B., Shivaji S. *Aquipuribacter nitratireducens* sp. nov., isolated from a soil sample of a mud volcano // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2015. – V. 65. – Iss. Pt_8. – P. 2391–2396.
222. Stolz J.F., Ellis D.J., Blum J.S., Ahmann D., Lovley D.R., Oremland R.S. *Sulfurospirillum barnesii* sp. nov. and *Sulfurospirillum arsenophilum* sp. nov., new members of the *Sulfurospirillum* clade of the epsilon *Proteobacteria* // *Int J Syst Bacteriol*. – 1999. – V. 49. – Pt 3. – P. 1177–1180.
223. Stougaard P., Jørgensen F., Johnsen M.G., Hansen O.C. Microbial diversity in ikaite tufa columns: an alkaline, cold ecological niche in Greenland // *Environ Microbiol*. – 2002. – V. 4. – № 8. – P. 487–493.
224. Sultanpuram V.R., Mothe T. *Salipaludibacillus aurantiacus* gen. nov., sp. nov. a novel alkali tolerant bacterium, reclassification of *Bacillus agaradhaerens* as *Salipaludibacillus agaradhaerens* comb. nov. and *Bacillus neizhouensis* as *Salipaludibacillus neizhouensis* comb. nov. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2016. – V. 66. – Iss. 7. – P. 2747–2753.
225. Sun Y.-T., Zhou N., Wang B.J., Liu X.D., Jiang C.Y., Ge X., Liu S.J. *Vallitalea okinawensis* sp. nov., isolated from Okinawa Trough sediment and emended description of the genus *Vallitalea* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2019. – V. 69. – Iss. 2. – P. 404–410.

226. Sunagawa S., DeSantis T.Z., Piceno Y.M., Brodie E.L., DeSalvo M.K., Woolstra C.R., Weil E., Andersen G.L., Medina M. Bacterial diversity and white plague disease-associated community changes in the Caribbean coral *Montastraea faveolata* // ISME J. – 2009. – V. 3. – № 5. – P. 512–521.
227. Suzuki D., Ueki A., Amaishi A., Ueki K. *Desulfovibrio portus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium in the class *Deltaproteobacteria* isolated from an estuarine sediment // J Gen Appl Microbiol. – 2009. – V. 55. – № 2. – P. 125–133.
228. Switzer Blum S.J., Burns Bindi A., Buzzelli J., Stolz J.F., Oremland R.S. *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic // Arch Microbiol. – 1998. – V. 171. – № 1. – P. 19–30.
229. Takahashi A., Kojima H., Watanabe M., Fukui M. *Pseudodesulfovibrio sediminis* sp. nov., a mesophilic and neutrophilic sulfate-reducing bacterium isolated from sediment of a brackish lake // Arch Microbiol. – 2022. – V. 204. – № 6. – P. 307.
230. Takami H., Inoue A., Fuji F., Horikoshi K. Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench // FEMS Microbiol Lett. – 1997. – V. 152. – № 2. – P. 279–285.
231. Tang Y.-Q., Li Y., Zhao J.Y., Chi C.Q., Huang L.X., Dong H.P., Wu X.L. Microbial communities in long-term, water-flooded petroleum reservoirs with different in situ temperatures in the Huabei Oilfield, China // PLoS One. – 2012. – V. 7. – № 3. – article e33535. doi: 10.1371/journal.pone.0033535.
232. Tindall B.J., Rosselló-Móra R., Busse H.J., Ludwig W., Kämpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2010. – V. 60. – Iss. Pt 1. – P. 249-266.
233. Trampe E., Castenholz R.W., Larsen J.E.N., Kühl M. Phototrophic microbes form endolithic biofilms in ikaite tufa columns (SW Greenland) // Environ Microbiol. – 2017. – V. 19. – № 11. – P. 4754–4770.
234. Trüper H.G., Schlegel H. G. Sulphur metabolism in *Thiorhodaceae* I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii* // Antonie van Leeuwenhoek. – 1964. – V. 30. – № 1. – P. 225–238.
235. Tu T.-H., Wu L.W., Lin Y.S., Imachi H., Lin L.H., Wang P.L. Microbial community composition and functional capacity in a terrestrial ferruginous, sulfate-depleted mud volcano // Front Microbiol. – 2017. – V. 8. – article 2137. doi: 10.3389/fmicb.2017.02137.

236. Venkadesaperumal G., Amaresan N., Kumar K. Plant growth promoting capability and genetic diversity of bacteria isolated from mud volcano and lime cave of Andaman and Nicobar Islands // *Braz J Microbiol.* – 2014. – V. 45. – № 4. – P. 1271–1281.
237. Wang H., Li J., Hu A., Qin D., Xu H., Yu C.P. *Melaminivora alkalimesophila* gen. nov., sp. nov., a melamine-degrading betaproteobacterium isolated from a melamine-producing factory // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2014. – V. 64. – Iss. Pt_6. – P. 1938–1944.
238. Watthanalomloet A., Tachaapaikoon C., Lee Y.S., Kosugi A., Mori Y., Tanasupawat S., Kyu K.L., Ratanakhanokchai K. *Cellulosibacter alkalithermophilus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic alkalithermophilic, cellulolytic-xylanolytic bacterium isolated from soil of a coconut garden // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2012. – V. 62. – Iss. Pt 10. – P. 2330–2335.
239. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // *Journal of Bacteriology.* – 1991. – V. 173. – № 2. – P. 697–703.
240. Westphal L., Wiechmann A., Baker J., Minton N.P., Müller V. The Rnf complex is an energy-coupled transhydrogenase essential to reversibly link cellular NADH and ferredoxin pools in the acetogen *Acetobacterium woodii* // *Journal of Bacteriology.* – 2018. – V. 200. – № 21. – article e00357-18. doi: 10.1128/JB.00357-18.
241. Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. Formation of methane by bacterial extracts // *J Biol Chem.* – 1963. – V. 238. – P. 2882–2886.
242. Woodside J.M., Ivanov M.K., Limonov A.F. Shallow gas and gas hydrates in the Anaximander Mountains region, eastern Mediterranean Sea // *Geological Society, London, Special Publications.* – 1998. – V. 137. – № 1. – P. 177–193.
243. Wrede C., Brady S., Rockstroh S., Dreier A., Kokoschka S., Heinzelmann S.M., Heller C., Reitner J., Taviani M., Daniel R., Hoppert M. Aerobic and anaerobic methane oxidation in terrestrial mud volcanoes in the Northern Apennines // *Sedimentary Geology.* – 2012. – V. 263–264. – P. 210–219.
244. Yakimov M.M., Giuliano L., Chernikova T.N., Gentile G., Abraham W.R., Lünsdorf H., Timmis K.N., Golyshin P.N. *Alcalilimnicola halodurans* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, moderately halophilic and extremely halotolerant bacterium, isolated from sediments of soda-depositing Lake Natron, East Africa Rift Valley. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2001. – V. 51. – Iss. 6. – P. 2133–2143.

245. Yakimov M.M., Giuliano L., Crisafi E., Chernikova T.N., Timmis K.N., Golyshin P.N. Microbial community of a saline mud volcano at San Biagio-Belpasso, Mt. Etna (Italy) // *Environmental Microbiology*. – 2002. – V. 4. – № 5. – P. 249–256.
246. Yamane K., Hattori Y., Ohtagaki H., Fujiwara K. Microbial diversity with dominance of 16S rRNA gene sequences with high GC contents at 74 and 98 °C subsurface crude oil deposits in Japan // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2011. – V. 76. – № 2. – P. 220–235.
247. Yang C.X., Liu Y.P., Bao Q.H., Feng F.Y., Liu H.R., Zhang X.J., Zhao Y.L. *Mongoliitalea lutea* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, halotolerant bacterium isolated from a haloalkaline lake // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2012a. – V. 62. – Iss. Pt_3. – P. 647–653.
248. Yang H.-M., Lou K., Sun J., Zhang T., Ma X.L. Prokaryotic diversity of an active mud volcano in the Usu City of Xinjiang, China // *J Basic Microbiol.* – 2012b. – V. 52. – № 1. – P. 79–85.
249. Yang R.-J., Zhou D., Wang Q.M., Han L., Peng W.S., Liu L., Wang X.J., Yan L., Lv J., Sheng J. *Puerhibacterium puerhi* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Promicromonosporaceae*, isolated from Pu-erh tea pile-fermentation // *Arch Microbiol.* – 2021. – V. 203. – № 4. – P. 1509–1518.
250. Yarza P., Yilmaz P., Pruesse E., Glöckner F.O., Ludwig W., Schleifer K.H., Whitman W.B., Euzéby J., Amann R., Rosselló-Móra R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences // *Nature Reviews Microbiology*. – 2014. – V. 12. – № 9. – P. 635–645.
251. Yoon S.-H., Ha S.M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H., Chun J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2017. – V. 67. – Iss. 5. – P. 1613–1617.
252. Zakharyuk A.G., Kozyreva L.P., Khijniak T.V., Namsaraev B.B., Shcherbakova V.A. *Desulfonatronum zhilinae* sp. nov., a novel haloalkaliphilic sulfate-reducing bacterium from soda Lake Alginskoe, Trans-Baikal Region, Russia // *Extremophiles*. – 2015. – V. 19. – № 3. – P. 673–680.
253. Zaunmüller T., Kelly D.J., Glöckner F.O., Uden G. Succinate dehydrogenase functioning by a reverse redox loop mechanism and fumarate reductase in sulphate-reducing bacteria // *Microbiology (UK)*. – 2006. – V. 152. – Iss. 8. – P. 2443–2453.
254. Zavarzina D.G., Zhilina T.N., Kuznetsov B.B., Kolganova T.V., Osipov G.A., Kotelev M.S., Zavarzin G.A. Description of *Anaerobacillus alkalilacustre* gen. nov., sp. nov.– strictly anaerobic diazotrophic bacillus isolated from soda lake and

transfer of *Bacillus arseniciselenatis*, *Bacillus macyae*, and *Bacillus alkalidiazotrophicus* to *Anaerobacillus* as the new combinations *A. arseniciselenatis* comb. nov., *A. macyae* comb. nov., and *A. alkalidiazotrophicus* comb. nov. // *Microbiology*. – 2009. – T. 78. – № 6. – C. 723–731.

255. Zavarzina D.G., Zhilina T.N., Kuznetsov B.B., Kolganova T.V., Osipov G.A., Kotelev M.S., Zavarzin G.A. *Natranaerobaculum magadiense* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, alkalithermophilic bacterium from soda lake sediment // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2013. – V. 63. – Iss. Pt_12. – P. 4456–4461.

256. Zavarzina D.G., Zhilina T.N., Kostrikina N.A., Toshchakov S.V., Kublanov I.V. *Isachenkonina alkalipeptolytica* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, alkaliphilic proteolytic bacterium capable of reducing Fe(III) and sulfur // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2020. – V. 70. – Iss. 8. – P. 4730–4738.

257. Zhang G., Zhang Y., Yin X., Wang S. *Nesterenkonina alkaliphila* sp. nov., an alkaliphilic, halotolerant actinobacteria isolated from the western Pacific Ocean // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2015. – V. 65. – Iss. Pt_2. – P. 516–521.

258. Zhang L., Qiu Y.Y., Zhou Y., Chen G.H., van Loosdrecht M.C.M., Jiang F. Elemental sulfur as electron donor and/or acceptor: mechanisms, applications and perspectives for biological water and wastewater treatment // *Water Res.* – 2021. – V. 202. – article 117373. doi: 10.1016/j.watres.2021.117373.

259. Zhang Y.-G., Wang H.F., Yang L.L., Zhou X.K., Zhi X.Y., Duan Y.Q., Xiao M., Zhang Y.M., Li W.J. *Egibacter rhizosphaerae* gen. nov., sp. nov., an obligately halophilic, facultatively alkaliphilic actinobacterium and proposal of Egibacteraceae fam. nov. and Egibacterales ord. nov. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2016a. – V. 66. – Iss. 1. – P. 283–289.

260. Zhang Y.-G., Lu X.H., Ding Y.B., Wang S.J., Zhou X.K., Wang H.F., Guo J.W., Liu Y.H., Duan Y.Q., Li W.J. *Lipingzhangella halophila* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Nocardiopsaceae // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2016b. – V. 66. – Iss. 10. – P. 4071–4076.

261. Zhao B., Chen S. *Alkalitalea saponilacus* gen. nov., sp. nov., an obligately anaerobic, alkaliphilic, xylanolytic bacterium from a meromictic soda lake // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2012. – V. 62. – Iss. Pt_11. – P. 2618–2623.

262. Zheng R., Wu S., Sun C. *Pseudodesulfovibrio cashew* sp. nov., a novel deep-sea sulfate-reducing bacterium, linking heavy metal resistance and sulfur cycle // *Microorganisms*. – 2021. – V. 9. – № 2. – article 429. doi: 10.3390/microorganisms9020429.
263. Zhilina T.N., Zavarzin G.A., Rainey F., Kevbrin V.V., Kostrikina N.A., Lysenko A.M. *Spirochaeta alkalica* sp. nov., *Spirochaeta africana* sp. nov., and *Spirochaeta asiatica* sp. nov., alkaliphilic anaerobes from the continental soda lakes in Central Asia and the East African Rift // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1996. – V. 46. – Iss. 1. – P. 305–312.
264. Zhilina T.N., Zavarzin G.A., Detkova E.N., Rainey F.A. *Natroniella acetigena* gen. nov., sp. nov., an Extremely Haloalkaliphilic, Homoacetic Bacterium: A New Member of Haloanaerobiales // *Curr Microbiol.* – 1996. – V. 32. – № 6. – P. 320–326.
265. Zhilina T.N., Zavarzin G.A., Rainey F.A., Pikuta E.N., Osipov G.A., Kostrikina N.A. *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, sulfate-reducing bacterium // *Int J Syst Bacteriol.* – 1997. – V. 47. – № 1. – P. 144–149.
266. Zhilina T.N., Detkova E.N., Rainey F.A., Osipov G.A., Lysenko A.M., Kostrikina N.A., Zavarzin G.A. *Natronoincola histidinovorans* gen. nov., sp. nov., A new alkaliphilic acetogenic anaerobe // *Curr Microbiol.* – 1998. – V. 37. – № 3. – P. 177–185.
267. Zhilina T.N., Zavarzina D.G., Kuever J., Lysenko A.M., Zavarzin G.A. *Desulfonatronum cooperativum* sp. nov., a novel hydrogenotrophic, alkaliphilic, sulfate-reducing bacterium, from a syntrophic culture growing on acetate // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2005b. – V. 55. – Iss. Pt 3. – P. 1001–1006.
268. Zhilina T.N., Zavarzina D.G., Panteleeva A.N., Osipov G.A., Kostrikina N.A., Tourova T.P., Zavarzin G.A. *Fuchsiella alkaliacetigena* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, lithoautotrophic homoacetogen from a soda lake // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2012. – V. 62. – Iss. Pt_7. – P. 1666–1673.
269. Zhilina T.N., Zavarzina D.G., Detkova E.N., Patutina E.O., Kuznetsov B.B. *Fuchsiella ferrireducens* sp. nov., a novel haloalkaliphilic, lithoautotrophic homoacetogen capable of iron reduction, and emendation of the description of the genus *Fuchsiella* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2015. – V. 65. – Iss. 8. – P. 2432–2440.

270. Zhiyong H., Song X., Yifan H., Yuan G., Yongli W., Chunhui S. Comparative study of Dushanzi and Baiyanggou mud volcano microbial communities in Junggar Basin in Xinjiang, China // International Research Journal of Public and Environmental Health. – 2016. – V. 3. – P. 244-256

271. Zhu D., Tanabe S.-H., Xie C., Honda D., Sun J., Ai L. *Bacillus ligniniphilus* sp. nov., an alkaliphilic and halotolerant bacterium isolated from sediments of the South China Sea // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2014. – V. 64. – Iss. Pt_5. – P. 1712–1717.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица III. Референсы штамма F3ap^T

Предполагаемый ген	Предсказанная функция	Совпадение по данным BLAST	% идентичности	Score	E-value
<u>Гликолиз (путь Эмбдена-Мейергоффа-Парнаса)</u>					
WP_162369941	Glucokinase	Vallitalea pronyensis	65.0	428	2e-147
WP_162369078	Glucose-6-phosphate isomerase	Youngiibacter fragilis	76.91	706	0.0
WP_162370399	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	Petrocella atlantisensis	79.08	535	0.0
WP_162370117	Fructose-6-phosphate aldolase	Clostridium oryzae	84.32	499	9e-177
WP_162368922	Triose-phosphate isomerase	Vallitalea guaymasensis	80.24	417	0.0
WP_162368923	Type I gliceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase	Petroclostridium xylanilyticum	87.76	621	0.0
WP_162370474	fructose-1,6-bisphosphatase	Petrocella atlantisensis	59.97	815	0.0
WP_162368924	Phosphoglycerate mutase	Natranaerovirga pectinivora	70.57	763	0.0

Таблица П1 (продолжение)

WP_162368925	Enolase	Natranaerovirga pectinivora	81.24	686	0.0
WP_162369222	Pyruvate kinase	Natranaerovirga pectinivora	48.55	48.55	5e-56
<u>Утилизация пентоз</u>					
WP_162370407	Xylulose kinase	Moorella thermoacetica	49.6	545	0.0
WP_162370409		Murimonas intestini	57.49	584	0.0
WP_162371580		Defluviitalea raffinosedens	66.37	626	0.0
WP_162369190	Xylose isomerase	Vibrio natriegens	85.53	559	0.0
WP_162369167		Clostridium algifaecis	79.17	506	1e-178
WP_162371296		Alkaliphilus metalliredigens	81.69	760	0.0
<u>Образование этанола</u>					

Таблица П1 (продолжение)

WP_162369383	Alcohol dehydrogenase	<i>Romboutsia faecis</i>	68.16	539	0.0
WP_162370162		<i>Crassaminicella indica</i>	80.67	1475	0.0
WP_162370594		<i>Enterocloster aldenensis</i>	44.74	329	1e-106
WP_162371100		<i>Pelosinus propionicus</i>	81.19	683	0.0
WP_162371102		<i>Mobilisporobacter senegalensis</i>	80.24	579	0.0
WP_162371582		<i>Vallitalea guaymasensis</i>	75.71	740	0.0

Таблица П2. Референсы штамма F-1^T

Предполагаемый ген	Предсказанная функция	Совпадение по данным BLAST	% идентичности	Score	E-value
<u>Диссимиляционное восстановление сульфата</u>					
WP_155932275	Sulfate adenylyltransferase	<i>P. aespoeensis</i>	93.46	838	0.0
WP_155934818	Manganese-dependent inorganic pyrophosphatase	<i>P. aespoeensis</i>	93.14	578	0.0
WP_155932273	Adenylyl-sulfate reductase subunit alpha, <i>aprA</i>	<i>P. aespoeensis</i>	96.54	665	0.0
WP_155932274	Adenylyl-sulfate reductase subunit betta, <i>aprB</i>	<i>P. aespoeensis</i>	92.77	323	3e-111
WP_155934369	Dissimilatory sulfite reductase, <i>dsrA</i>	<i>P. aespoeensis</i>	91.08	439	0.0
WP_155934371	Dissimilatory sulfite reductase, <i>dsrB</i>	<i>P. aespoeensis</i>	93.44	381	0.0
WP_155934373	Dissimilatory sulfite reductase, <i>dsrD</i>	<i>P. aespoeensis</i>	91.36	154	3e-47
WP_155932789	Dissimilatory sulfite reductase, <i>dsrC</i>	<i>P. aespoeensis</i>	98.1	213	2e-69
WP_155932960	Sulfate reduction electron transport complex DsrMKJOP, subunit <i>dsrM</i>	<i>P. aespoeensis</i>	92.75	615	0.0
WP_155932962	Sulfate reduction electron transport complex DsrMKJOP, subunit <i>dsrK</i>	<i>P. aespoeensis</i>	95.23	1100	0.0

Таблица П2 (продолжение)

WP_155932964	Sulfate reduction electron transport complex DsrMKJOP, subunit <i>dsrJ</i>	<i>P. aespoeensis</i>	90.7	257	2e-86
WP_155932966	Sulfate reduction electron transport complex DsrMKJOP, subunit <i>dsrO</i>	<i>P. aespoeensis</i>	80.93	422	2e-147
WP_155932968	Sulfate reduction electron transport complex DsrMKJOP, subunit <i>dsrP</i>	<i>P. aespoeensis</i>	93.4	768	0.0
WP_155932270	Quinone-interacting membrane-bound oxidoreductase complex, subunit <i>QmoC</i>	<i>P. aespoeensis</i>	91.02	816	0.0
WP_155932271	Quinone-interacting membrane-bound oxidoreductase complex, subunit <i>QmoB</i>	<i>P. aespoeensis</i>	92.24	1442	0.0
WP_155932272	Quinone-interacting membrane-bound oxidoreductase complex, subunit <i>QmoA</i>	<i>P. aespoeensis</i>	91.06	794	0.0
<u>Гликолиз (путь Эмбдена-Мейергоффа-Парнаса)</u>					
WP_155934773	Glucokinase	<i>P. aespoeensis</i>	62.7	376	3e-127
WP_155933078	Glucose-6-phosphate isomerase	<i>P. aespoeensis</i>	86.77	789	0.0
WP_155932944	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	<i>P. aespoeensis</i>	85.49	778	0.0
WP_155932253	Fructose-6-phosphate aldolase	<i>P. aespoeensis</i>	90.7	409	2e-143
WP_155934884	Triose-phosphate isomerase	<i>P. aespoeensis</i>	80.08	414	1e-144
WP_155935066	Type I gliceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase	<i>P. aespoeensis</i>	89.6	608	0.0

Таблица П2 (продолжение)

WP_155934885	Phosphoglycerate kinase	<i>P. aespoeensis</i>	84.00	697	0.0
WP_155934983	Phosphoglycerate mutase	<i>P. aespoeensis</i>	85.46	894	0.0
WP_155935413	Enolase	<i>P. aespoeensis</i>	94.41	812	0.0
WP_155932114	Pyruvate kinase	<i>P. aespoeensis</i>	94.02	939	0.0
<u>Восстановительный глициновый путь</u>					
WP_155935412	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase <i>MetCD</i>	<i>P. aespoeensis</i>	95.09	553	0.0
WP_155931435	Aminomethyl-transferring glycine dehydrogenase, subunit <i>GcvPB</i>	<i>P. aespoeensis</i>	92.5	892	0.0
WP_155931434	Aminomethyl-transferring glycine dehydrogenase, subunit <i>GcvPA</i>	<i>P. aespoeensis</i>	91.89	840	0.0
WP_155931433	Glycine cleavage system protein <i>GcvH</i>	<i>D. desulfuricans</i>	84.13	218	8e-71
WP_155934920	Glycine cleavage system aminomethyltransferase <i>GcvT</i>	<i>P. aespoeensis</i>	83.33	636	0.0
WP_155933332	Ammonium transporter <i>AT</i>	<i>P. aespoeensis</i>	92.75	717	0.0
WP_155934944	Thioredoxin-disulfide oxidoreductase <i>SHMT</i>	<i>P. aespoeensis</i>	87.21	541	0.0
WP_155932339	Serine dehydratase <i>SDA</i>	<i>P. aespoeensis</i>	90.18	723	0.0

Таблица П2 (продолжение)

WP_155934679	Phosphate acetyltransferase	P. aespoeensis	94.89	1364	0.0
WP_155934680	Acetate kinase	P. aespoeensis	90.52	754	0.0
WP_155933714	Acetyl-CoA synthetase	P. aespoeensis	91.81	1269	0.0
WP_155934675	Pyruvate ferredoxin:oxidoreductase	P. aespoeensis	91.92	2481	0.0
<u>Цикл трикарбоновых кислот</u>					
WP_155934624	Cirate synthase	P. aespoeensis	91.24	840	0.0
WP_155932278	Aconitase	P. aespoeensis	89.81	1178	0.0
WP_155932020	Isocitrate dehydrogenase	P. aespoeensis	92.63	729	0.0
WP_155935188	Succinyl-CoA synthetase	P. aespoeensis	78.98	1120	0.0
WP_155932566	Fumarase	P. aespoeensis	91.76	504	2e-179
WP_155932568		P. aespoeensis	89.62	339	4e-117
WP_155932561	Succinate dehydrogenase/fumarate reductase (cyt.b subunit)	P. aespoeensis	94.44	414	2e-145
WP_155932563	Fumarate reductase (flavoprotein subunit)	P. aespoeensis	93.78	1200	0.0
WP_155932564	Fumarate reductase (iron-sulfur subunit)	P. aespoeensis	97.55	498	5e-178
WP_155932566	Fumarate hydratase, subunit alpha	P. aespoeensis	91.76	504	3e-179
WP_155932568	Fe-S containing hydro-lyase, subunit betta	P. aespoeensis	89.62	339	4e-117

Таблица П2 (продолжение)

WP_155934516	Malate dehydrogenase	<i>D. oxyclinae</i>	86.96	776	0.0
<u>Гидрогеназы</u>					
WP_155931905	Periplasmic hydrogenase <i>hynAB</i> , large subunit	<i>P. aespoeensis</i>	93.36	1117	0.0
WP_155931907	Periplasmic hydrogenase <i>hynAB</i> , small subunit	<i>P. aespoeensis</i>	90.55	611	0.0
WP_155931624	(Ni-Fe) hydrogenase maturation system HypABCDEF, subnunit A	<i>P. aespoeensis</i>	93.41	620	0.0
WP_155931626	(Ni-Fe) hydrogenase maturation system HypABCDEF, subnunit D	<i>P. aespoeensis</i>	91.21	688	0.0
WP_155931901	(Ni-Fe) hydrogenase maturation system HypABCDEF, subnunit C	<i>P. aespoeensis</i>	94.12	162	5e-50
WP_155935612	(Ni-Fe) hydrogenase maturation system HypABCDEF, subnunit B	<i>P. aespoeensis</i>	90.41	412	1e-144
WP_196772909	(Ni-Fe) hydrogenase maturation system HypABCDEF, subnunit B	<i>P. cashew</i>	86.32	213	3e-69
WP_155931785	(Ni-Fe) hydrogenase maturation system HypABCDEF, subnunit F	<i>P. aespoeensis</i>	87.32	1395	0.0
<u>Арсенат редуктаза</u>					
WP_155934701, WP_155934643	Arsenate reductase, <i>arsC</i>	<i>P. aespoeensis</i>	69.54, 84.89	232, 248	1e-75, 2e-82

Таблица П2 (продолжение)

<u>Нитрогеназный комплекс <i>nifDHK</i></u>					
WP_155934608	Nitrogenase iron protein	<i>P. indicus</i>	97.45	542	0.0
WP_155934611	Nitrogenase molybdenum-iron protein, subunit alpha	<i>P. aespoeensis</i>	94.31	1081	0.0
WP_155934612	Nitrogenase molybdenum-iron protein, subunit beta		94.97	912	0.0
WP_155934609	P-II family nitrogen regulator	<i>P. profundus</i>	93.46	201	1e-64
WP_155934610		<i>P. aespoeensis</i>	91.94	228	4e-75

Таблица П3. Референсы штамма T05b^T

Предполагаемый ген	Предсказанная функция	Совпадение по данным BLAST	% идентичности	Score	E-value
<u>Углеродный метаболизм</u>					
WP_205459850	FAD-dependent oxidoreductase	<i>S. arcachonense</i>	75.56	722	0.0
WP_205460080	Fumarate hydratase	<i>Arcobacter vandammei</i>	74.75	752	0.0
WP_205458054	Sodium ion-translocating decarboxylase	<i>S. deleyianum</i>	75.80	630	0.0
WP_205458055		<i>S. arcachonense</i>	78.88	993	0.0

Таблица ПЗ (продолжение)

MBN2964121	Acetate kinase	<i>S. deleyianum</i>	58.25	491	1e-169
WP_205458672	Phosphate acetyltransferase	<i>S. barnesii</i>	65.86	959	0.0
<u>Пентозофосфатный путь</u>					
WP_205459953	Glucose-6-phosphate isomerase	<i>Campylobacter showae</i>	55.72	474	7e-163
WP_205458430	Ribulose-5-phosphate 3 epimerase	<i>S. multivorans</i>	81.69	352	6e-121
WP_205457799	Transketolase	<i>S. barnesii</i>	74.61	1012	0.0
WP_205457853	Transaldolase	<i>S. diekertiae</i>	59.04	382	7e-129
WP_205457799	Transketolase	<i>S. arcachonense</i>	75.90	1036	0.0
<u>НАДН: хиноноксидоредуктазоподобные комплексы</u>					
а) Комплекс ϵ -протеобактериального типа					
WP_205458496	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 3	<i>S. arcachonense</i>	75.97	211	6e-68
WP_205458497	NADH-quinone oxidoreductase subunit B	<i>Campylobacter curvus</i>	88.69	320	8e-110
WP_205458498	NADH-quinone oxidoreductase subunit C	<i>S. oryzae</i>	57.95	324	3e-108
WP_205458499	NADH dehydrogenase (quinone) subunit D	<i>S. cavolei</i>	78.38	691	0.0

Таблица ПЗ (продолжение)

WP_205458500	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit E	<i>S. arcachonense</i>	75.34	120	1e-33
WP_205458501	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit G	<i>S. arsenophilum</i>	37.50	139	3e-35
WP_205458502	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoI	<i>S. arcachonense</i>	72.77	298	6e-100
WP_205458503	NADH-quinone oxidoreductase subunit J	<i>S. multivorans</i>	70.39	259	4e-85
WP_205458504	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoK	<i>S. arcachonense</i>	84.00	176	1e-54
WP_205458505	NADH-quinone oxidoreductase subunit L	<i>S. arcachonense</i>	76.66	955	0.0
WP_205458506	NADH-quinone oxidoreductase subunit M	<i>S. multivorans</i>	75.45	790	0.0
WP_205458507	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoN	<i>S. multivorans</i>	69.92	708	0.0
б) Комплекс с высокой степенью схожести с <i>nuoEF E. coli</i>					
WP_205457951	2Fe-2S iron-sulfur cluster-binding protein	<i>S. cavolei</i>	53.32	501	8e-171
WP_205457952	NADH-quinone oxidoreductase subunit H	<i>S. arsenophilum</i>	62.44	564	0.0

Таблица ПЗ (продолжение)

WP_205457953	NADH-quinone oxidoreductase subunit I	<i>S. cavolei</i>	72.44	240	6e-78
WP_205457954	NADH-quinone oxidoreductase subunit J	<i>S. barnesii</i>	57.58	175	2e-52
WP_205457955	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoK	<i>Arcobacter porcinus</i>	53.06	114	4e-30
WP_205457956	NADH-quinone oxidoreductase subunit L	<i>S. cavolei</i>	55.90	664	0.0
WP_205457957	NADH-quinone oxidoreductase subunit M	<i>S. arcachonense</i>	65.63	630	0.0
WP_205457958	NADH-quinone oxidoreductase subunit N	<i>S. arcachonense</i>	57.09	545	0.0
WP_205457959	Crp/Fnr family transcriptional regulator	<i>S. arcachonense</i>	64.15	283	3e-93
WP_205457960	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoF	<i>S. barnesii</i>	67.72	563	0.0
WP_205457961	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoE	<i>S. multivorans</i>	56.77	194	5e-60
WP_205457962	NADH-quinone oxidoreductase subunit D	<i>S. oryzae</i>	71.79	788	0.0
WP_205457963	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoB	<i>S. arcachonense</i>	86.71	321	7e-110

Таблица ПЗ (продолжение)

WP_205457964	NADH-quinone oxidoreductase subunit A	<i>S. arsenophilum</i>	60.00	149	1e-43
<u>Азотный метаболизм</u>					
а) нитратредуктаза Nap типа – <i>napAGHBFLD</i>					
WP_205459257	chaperone NapD	<i>S. arcachonense</i>	64.35	160	3e-48
WP_205459258	chaperone NapL	<i>S. arsenophilum</i>	53.50	346	4e-115
WP_205459259	ferredoxin-type protein NapF	<i>Arcobacter arenosus</i>	43.75	148	2e-43
WP_205459260	nitrate reductase cytochrome c-type subunit NapB	<i>S. barnesii</i>	48.50	187	1e-57
WP_205459261	quinol dehydrogenase ferredoxin subunit NapH	<i>S. cavolei</i>	66.55	385	2e-133
WP_205459262	ferredoxin-type protein NapG	<i>S. cavolei</i>	71.97	408	4e-142
WP_205459263	nitrate reductase catalytic subunit NapA	<i>Halarcobacter bivalviorum</i>	80.88	1600	0.0
б) нитритредуктаза <i>nrfHAIJ</i>					
WP_205459266	NrfJ	<i>S. diekertiae</i>	51.94	216	5e-68
WP_205459267	NrfI	<i>Wolinella succinogenes</i>	46.90	731	0.0

Таблица ПЗ (продолжение)

WP_205459268	NrfA	Wolinella succinogenes	69.31	746	0.0
WP_205459269	cytochrome c nitrite reductase small subunit NrfH	S. halorespirans	76.14	290	1e-98
в) нитрогеназный комплекс <i>nifHDKE</i>					
WP_205459985	nitrogenase iron protein	Sulfuricurvum kujiense	83.56	526	0.0
WP_205459986	nitrogenase iron protein	Wolinella succinogenes	39.20	94	7e-23
WP_205459987	nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	Sulfuricurvum kujiense	82.10	857	0.0
WP_205459988	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	Sulfuricurvum kujiense	76.12	834	0.0
WP_205459989	nitrogenase iron-molybdenum cofactor biosynthesis protein NifE	Geoalkalibacter ferrihydriticus	72.44	686	0.0
WP_205459990	nitrogen fixation protein NifX	Roseibium litorale	48.76	132	2e-37
WP_205459991	flavodoxin	S. arcachonense	58.33	209	9e-67
WP_205459992	nitrogenase-stabilizing/protective protein NifW	Halarcobacter ebronensis	41.28	102	2e-26

Таблица ПЗ (продолжение)

WP_205459993	Hypothetical protein	<i>S. arcachonense</i>	46.43	99	3e-25
WP_205459994	2Fe-2S iron-sulfur cluster-binding protein	<i>Arcobacter nitrofigilis</i>	75.00	156	4e-47
WP_205459995	RNA polymerase factor sigma-54	<i>Sulfurovum zhangzhouensis</i>	51.57	414	8e-139
WP_205459996	aldo/keto reductase	<i>Sulfurovum kujiense</i>	48.90	356	2e-117
WP_205459997	FAD-dependent oxidoreductase	<i>Sulfurimonas lithotrophica</i>	54.97	594	0.0
WP_205459998	nitrogen fixation protein NifT	<i>Sulfurimonas lithotrophica</i>	68.12	107	3e-28
WP_205459999	nitrogenase iron-molybdenum cofactor biosynthesis protein NifN	<i>Desulfuromonas acetexigens</i>	57.89	485	1e-166
<u>Серный метаболизм</u>					
WP_205459460	thiosulfate reductase PhsA	<i>S. halorespirans</i>	75.33	1229	0.0
WP_205459461	4Fe-4S dicluster domain-containing protein	<i>S. oryzae</i>	79.06	322	9e-110
WP_205459462	PsrC family molybdoenzyme membrane anchor subunit	<i>S. oryzae</i>	75.71	479	1e-167

Таблица ПЗ (продолжение)

WP_205458630	Sqr oxidoreductase	<i>S. arcachonense</i>	70.06	737	0.0
<u>Метаболизм мышьяка</u>					
WP_205459496	Arsenate reductase, AsrA	<i>S. multivorans</i>	74.15	1334	0.0
WP_205459497	Arsenate reductase, AsrB	<i>S. barnesii</i>	79.74	392	5e-136
WP_205460022	thioredoxin family protein	<i>Wolinella succinogenes</i>	76.00	112	4e-30
WP_205460023	permease	<i>Malaciobacter marinus</i>	74.13	488	3e-171
WP_205460024	arsenate reductase ArsC	<i>Arcobacter venerupis</i>	79.84	215	2e-69
WP_205460025	ACR3 family arsenite efflux transporter	<i>Natronincola peptidivorans</i>	80.46	555	0.0
WP_205460026	arsenate reductase ArsC	<i>Oryzomonas rubra</i>	58.54	179	5e-54
WP_205460027	arsenic transporter	<i>Hydrogenimonas thermophila</i>	67.56	572	0.0
<u>Гидрогеназы</u>					
WP_205458701	hydrogenase maturation nickel metallochaperone HypA	<i>S. arsenophilum</i>	69.03	174	8-54

Таблица ПЗ (продолжение)

WP_205458702	hydrogenase expression/formation protein HypE	<i>S. arcachonense</i>	75.00	509	0.0
WP_205458703	hydrogenase formation protein HypD	<i>S. oryzae</i>	74.73	588	0.0
WP_205458704	HypC/HybG/HupF family hydrogenase	<i>S. arcachonense</i>	76.67	135	6e-39
WP_205458705	hydrogenase nickel incorporation protein HypB	<i>S. arsenophilum</i>	75.53	418	4e-145
WP_205458706	Hypothetical protein	<i>S. arcachonense</i>	37.67	167	3e-47
WP_205458707	nickel-responsive transcriptional regulator NikR	<i>S. arcachonense</i>	83.09	246	3e-81
WP_205458708	Hypothetical protein	<i>S. arsenophilum</i>	39.64	390	1e-125
WP_205458709	HyaD/HybD family hydrogenase maturation endopeptidase	<i>S. deleyianum</i>	73.74	278	2e-92
WP_205458710	Ni/Fe-hydrogenase, b-type cytochrome subunit	<i>S. arcachonense</i>	69.51	339	2e-115
WP_205458711	nickel-dependent hydrogenase large subunit	<i>S. arcachonense</i>	77.32	961	0.0
WP_205458712	hydrogenase small subunit	<i>S. arsenophilum</i>	81.30	642	0.0
WP_205458713	Hypothetical protein	<i>S. arsenophilum</i>	69.14	122	7e-34

Таблица П3 (продолжение)

WP_205458714	nickel-dependent hydrogenase large subunit	<i>S. arcachonense</i>	53.71	507	1e-174
WP_205458715	hydrogenase	<i>S. diekertiae</i>	61.49	393	3e-134

Таблица П4. Референсы штамма H1^T

Предполагаемый ген	Предсказанная функция	Совпадение по данным BLAST	% идентичности	Score	E-value
<u>Гликолиз (путь Эмбдена-Мейергоффа-Парнаса)</u>					
WP_265423680	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>D. alkaliphilus</i>	89.55	624	0.0
WP_265423679	triose-phosphate isomerase	<i>D. mexicanus</i>	70.75	383	1e-131
WP_265426043	glucose-6-phosphate isomerase	<i>D. mexicanus</i>	60.64	659	0.0
WP_265423283	phosphoglycerate kinase	<i>D. alkaliphilus</i>	86.15	689	0.0
WP_265423752	phosphopyruvate hydratase	<i>D. mexicanus</i>	90.52	779	0.0
WP_265423750	pyruvate kinase	<i>D. mexicanus</i>	80.30	756	0.0
WP_265423438	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	<i>D. mexicanus</i>	78.84	670	0.0
WP_265423362	fructose-bisphosphate aldolase	<i>D. mexicanus</i>	94.15	833	0.0

Таблица П4 (продолжение)

WP_265426113	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	D. alkaliphilus	74.25	767	0.0
<u>Серный метаболизм</u>					
WP_265426333	inorganic pyrophosphatase Ppa	D. mexicanus	83.64	199	2e-63
WP_265426087	adenylyl-sulfate reductase subunit alpha	D. alkaliphilus	98.18	13.57	0.0
WP_265426088	adenylyl-sulfate reductase subunit beta	Desulforegula conservatrix	87.16	275	0.0
WP_26542589	hypothetical protein	D. alkaliphilus	51.91	400	8e-135
WP_26542590	dissimilatory-type sulfite reductase subunit alpha	D. mexicanus	98.41	912	0.0
WP_26542591	dissimilatory-type sulfite reductase subunit beta	D. mexicanus	97.91	793	0.0
WP_26542592	dissimilatory sulfite reductase D family protein	D. alkaliphilus	96.25	159	0.0
WP_265425905	sulfate reduction electron transfer complex DsrMKJOP subunit DsrM	D. mexicanus	91.21	626	0.0
WP_265425906	sulfate reduction electron transfer complex DsrMKJOP subunit DsrK	D. alkaliphilus	97.58	1102	0.0
WP_265425907	sulfate reduction electron transfer complex DsrMKJOP subunit DsrJ	D. alkaliphilus	88.72	233	4e-76

Таблица П4 (продолжение)

WP_265425908	sulfate reduction electron transfer complex DsrMKJOP subunit DsrO	D. alkaliphilus	90.91	514	0.0
WP_265425909	sulfate reduction electron transfer complex DsrMKJOP subunit DsrP	D. mexicanus	97.91	751	0.0
<u>β-окисление жирных кислот</u>					
WP_265423377	acyl-CoA dehydrogenase	D. alkaliphilus	95.00	1195	0.0
WP_265423968	enoyl-CoA hydratase/isomerase	D. alkaliphilus	96.67	483	8e-172
WP_265423389	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	D. alkaliphilus	81.00	518	0.0
WP_265423278	acetyl-CoA C-acetyltransferase	D. alkaliphilus	94.16	822	0.0
<u>Азотный метаболизм</u>					
WP_265425310	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	D. alkaliphilus	99.56	946	0.0
WP_265425311	nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	D. mexicanus	98.53	1120	0.0
WP_265425312	P-II family nitrogen regulator	D. mexicanus	96.03	236	7e-78
WP_265425313	P-II family nitrogen regulator	D. mexicanus	99.15	233	6e-77
WP_265425314	nitrogenase iron protein	D. mexicanus	98.18	545	0.0
WP_265425306	nitrogenase cofactor biosynthesis protein NifB	D. mexicanus	96.30	864	0.0

Таблица П4 (продолжение)

WP_265425307	nitrogenase component 1	D. mexicanus	95.85	902	0.0
WP_265425308	Hypothetical protein	D. mexicanus	95.28	124	0.0
WP_265425309	nitrogenase iron-molybdenum cofactor	D. alkaliphilus	98.43	906	0.0

Таблица П5. Референсы штамма FN5suc^T

Предполагаемый ген	Предсказанная функция	Совпадение по данным BLAST	% идентичности	Score	E-value
<u>Гликолиз (путь Эмбдена-Мейергоффа-Парнаса)</u>					
WP_275842279	glucokinase	P. atlantisensis	97.49	632	0.0
WP_275842361	glucose-6-phosphate isomerase	P. atlantisensis	95.07	872	0.0
WP_275841786	6-phosphofructokinase	P. atlantisensis	96.36	704	0.0
WP_275842087	fructose-1,6-bisphosphatase	P. atlantisensis	95.08	1280	0.0
WP_275842726	fructose-bisphosphate aldolase	P. atlantisensis	96.52	565	0.0
WP_275841147	triosephosphate isomerase	P. atlantisensis	96.77	489	0.0
WP_275841150	NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P. atlantisensis	98.81	677	0.0
WP_275841145	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	P. atlantisensis	93.76	1003	0.0

Таблица П5 (продолжение)

WP_275841141	enolase	<i>P. atlantisensis</i>	96.77	957	0.0
WP_275840639	pyruvate kinase	<i>P. atlantisensis</i>	97.48	942	0.0
WP_275841373	xylulose kinase	<i>P. atlantisensis</i>	86.42	931	0.0
WP_275840899	xylose isomerase	<i>P. atlantisensis</i>	95.95	642	0.0
<u>Азотный метаболизм</u>					
WP_275841819	nitrogenase iron protein	<i>P. atlantisensis</i>	98.90	553	0.0
WP_275841820	P-II family nitrogen regulator	<i>P. atlantisensis</i>	97.20	211	2e-15
WP_275841821	P-II family nitrogen regulator	<i>P. atlantisensis</i>	99.21	252	5e-84
WP_275841822	nitrogenase molybdenum-iron protein alpha	<i>P. atlantisensis</i>	99.25	1095	0.0
WP_275841823	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>P. atlantisensis</i>	99.12	936	0.0
WP_275841824	nitrogenase iron-molybdenum cofactor biosynthesis protein NifE	<i>P. atlantisensis</i>	96.09	962	0.0
WP_275841825	nitrogenase component 1	<i>P. atlantisensis</i>	91.05	957	0.0
WP_275841826	nitrogenase cofactor biosynthesis protein NifB	<i>P. atlantisensis</i>	97.59	598	0.0