

## **DESULFOBOTULUS PELOPHILUS SP. NOV. – АЛКАЛИФИЛЬНАЯ СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩАЯ БАКТЕРИЯ ИЗ НАЗЕМНОГО ГРЯЗЕВОГО ВУЛКАНА**

© 2023 г. А. А. Фролова<sup>a</sup>, \*, А. Ю. Меркель<sup>a</sup>, А. А. Кучиерская<sup>a</sup>, А. И. Слободкин<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: romana2804@gmail.com

Поступила в редакцию 03.03.2023 г.

После доработки 24.03.2023 г.

Принята к публикации 25.03.2023 г.

Алкалифильная сульфатвосстанавливающая анаэробная бактерия (штамм H1<sup>T</sup>) была выделена из наземного грязевого вулкана Таманского полуострова. Клетки изолята представляют собой грамотрицательные подвижные вибрионы толщиной 1 мкм и длиной 2.0–2.5 мкм. Штамм H1<sup>T</sup> растет при температуре 14–42°C (оптимум 37°C), pH 8.5–10.5 (оптимум 9.5) и концентрации NaCl 0.5–6% (вес/об.) (оптимум 0.5–1.5%); 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. Штамм H1<sup>T</sup> не использует тиосульфат, ДМСО, фумарат, нитрат, нитрит, арсенат, селенит и Fe(III) в качестве акцептора электронов, не диспропорционирует элементную серу, тиосульфат и сульфит и не сбраживает глюкозу, фруктозу, сахарозу, трегалозу, галактозу, ксилозу, фумарат, цитрат, дрожжевой экстракт и пептон. В жирнокислотном составе клеток преобладают C<sub>20:0</sub> (54.2%), C<sub>22:0</sub> (24.6%) и C<sub>18:0</sub> (11.1%). Геном штамма H1<sup>T</sup> имеет размер 3.66 Мп и содержание G + Ц 51.1%. В геноме содержатся гены, кодирующие ферменты диссимиляционной сульфатредукции и β-окисления жирных кислот. По результатам анализа гена 16S рРНК ближайшим родственным микроорганизмом штамма H1<sup>T</sup> является *Desulfobotulus mexicanus* (98.3% сходства). На основании фенотипических характеристик и данных филогенетического анализа предлагается отнести данный изолят к новому виду рода *Desulfobotulus*, как *Desulfobotulus pelophilus* sp. nov. с типовым штаммом H1<sup>T</sup> (=DSM 112796<sup>T</sup> = VKM B-3697<sup>T</sup> = UQM 41590<sup>T</sup>).

**Ключевые слова:** алкалифил, сульфатредукция, анаэробные бактерии, грязевой вулкан, *Desulfobacterales*

**DOI:** 10.31857/S0026365623600074, **EDN:** RJZOJS

Грязевой вулканизм — широко распространенное геологическое явление, играющее значительную роль в балансе метана в атмосфере (Mazzini, Etiope, 2017). Наземные грязевые вулканы (НГВ) образуются за счет выброса частиц глины и ила, брекчий, жидкостей и газов из глубоких осадочных слоев. Полуостров Тамань является одним из регионов с наиболее интенсивным грязевым вулканизмом. В Керченско-Таманской грязевулканической провинции находятся более 100 действующих НГВ (Гнатенко и соавт., 1986; Холодов и соавт., 2012). Щелочные условия флюидов этих местообитаний (значения pH выше 8.5) объясняют развитие в них алкалифильных микроорганизмов (Khomyakova et al., 2020, 2022; Frolova et al., 2021a; Фролова и соавт., 2023). В НГВ анаэробные прокариоты участвуют в биогеохимических круговоротах углерода, серы и других элементов. Сульфатвосстанавливающие бактерии могут принимать участие в анаэробном окислении метана как синтрофные партнеры метано-

трофных архей (Knittel, Boetius, 2009). Данные о культивировании сульфатредуцирующих бактерий из НГВ немногочисленны (Alain et al., 2006; Frolova et al., 2021b), однако использование молекулярных подходов показывает, что в этих микробных сообществах постоянно присутствуют микроорганизмы, филогенетически родственные известным сульфатредукторам (Tu et al., 2017; Ren et al., 2018; Merkel et al., 2021). Одной из крупнейших и старейших таксономических групп сульфатредукторов является порядок *Desulfobacterales*, характерной особенностью которого является использование жирных кислот в качестве источника углерода и энергии (Kuever et al., 2015). Представители *Desulfobacterales* обитают в анаэробных осадках пресноводных, морских и содовых водоемов и включают бактерии различных физиологических групп (алкалифильные, психрофильные, галофильные магнитотактические, углеводородразлагающие). Согласно List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature, этот поряд-

док включает 37 родов с официально опубликованными названиями (Parte et al., 2020).

В настоящей работе приводится описание штамма анаэробной солетолерантной облигатно-алкалифильной сульфатовосстанавливающей бактерии, выделенной из наземного грязевого вулкана полуострова Тамань и отнесенной нами к новому виду рода *Desulfobotulus*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Источник выделения.** Образец грязевулканического флюида, содержащего твердую и жидкую фракции, был отобран в мае 2017 г. из активного грифона наземного грязевого вулкана Гнилая Гора, Таманский полуостров, Краснодарский край, РФ. GPS координаты – 45.251° N, 37.436° E. Температура в месте отбора проб составляла 21°C, pH 8.5, концентрация  $\text{Cl}^-$  – 15.7 mM, концентрация  $\text{SO}_4^{2-}$  – 5.3 mM. Образец был отобран анаэробно в пластиковую пробирку с плотно закручивающийся крышкой и в таком виде перевезен в лабораторию для дальнейших экспериментов.

**Среды и культивирование.** Для выделения и рутинного культивирования штамма H1<sup>T</sup> использовали анаэробную восстановленную солоноватую среду следующего состава (на 1 л дистиллированной воды): 0.33 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.33 г  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.33 г  $\text{KCl}$ , 0.33 г  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 2.00 г  $\text{NaHCO}_3$ , 0.33 г  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 20.00 г  $\text{NaCl}$ , 0.001 г резазурина, 1 мл витаминов (Wolin et al., 1963) и 1 мл микроэлементов (Slobodkin et al., 2012). Среду готовили кипячением и охлаждением под непрерывным током  $\text{N}_2$ , после чего добавляли восстанавливающий агент ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ). Приготовленную среду разливали по 10 мл в пробирки Хангейта объемом 17 мл и автоклавировали при 121°C в течение 60 мин. После стерилизации pH среды был 9.0. Пируват натрия (10 mM) и сульфат натрия (14 mM) добавляли из стерильных концентрированных растворов перед инокуляцией образца.

**Фенотипические характеристики.** Изучение морфологии и подвижности клеток проводили в жидкой среде после 48 ч инкубации, используя микроскоп Zeiss Primo Star с фазово-контрастным устройством. Ростовые эксперименты проводили в трехкратной повторности. Для морфологической, физиологической и метаболической характеристики штамм H1<sup>T</sup> культивировали на среде, применявшейся для выделения, если не указано иное. Определение диапазонов температуры, pH и солёности проводились на восстановленной среде с пируватом и сульфатом. Диапазоны солёности измеряли при концентрации  $\text{NaCl}$  0–10% (вес/об.). Различные значения pH задавали с помощью следующих буферов (Good's buffers, "Sigma-Aldrich", 30 г/л): MES (pH 6 и 6.5),

HEPES (pH 7 и 7.5), Tricine (pH 8.0 и 8.5), CAPSO (pH 9.0 и 9.5) и CAPS (pH 10 и 11). Эксперименты с серосодержащими соединениями и кислородом проводили на невосстановленной среде.

**Аналитические процедуры.** Определение газообразных продуктов метаболизма проводили методом газовой хроматографии на колонке HayeSep N 80/100 mesh при 40°C и скорости потока 20 мл/мин. В качестве газа-носителя использовали аргон. Сульфид определяли колориметрически с диметил-*n*-фенилендиамин (Grüper, Schlegel, 1964).

**Состав клеточных жирных кислот.** Состав жирных кислот определяли, как указано ранее (Slobodkina et al., 2020), используя прямое метилирование лиофильно высушенной биомассы бактерий и хромато-масс-спектрометрический анализ; содержание определяли по методу внутренней нормализации по площади пиков полного ионного тока метиловых эфиров жирных кислот.

**Выделение ДНК, секвенирование и анализ полного генома.** Выделение ДНК для определения нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и полногеномного секвенирования проводили с помощью FastDNA Spin Kit ("MP Bio"), следуя протоколу производителя. Ген 16S рРНК амплифицировали, используя универсальные бактериальные праймеры 27F, 357F, 530F, 1114F, 342R, 519R и 1492R (Weisburg et al., 1991). Секвенирование продуктов ПЦР проводили методом Сэнгера. Предварительный филогенетический скрининг сходства последовательностей генов 16S рРНК проводили по базе данных GenBank (Benson et al., 1999) с помощью программы BLAST (Altschul et al., 1990). Для более точного определения филогенетического положения изолята нуклеотидную последовательность гена 16S рРНК выравнивали с последовательностями референтных штаммов ближайших родственных микроорганизмов с помощью программы Clustal W (Thompson, 1997). Филогенетический анализ выполняли при помощи программы MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Статистическую достоверность ветвления оценивали с помощью "bootstrap-анализа" 1000 альтернативных филограм (Felsenstein, 1985), построенных методами, входящими в пакет программ для филогенетического анализа MEGA 7.

Геном штамма H1<sup>T</sup> секвенировали, используя систему MiSeq ("Illumina", San Diego, California, США). Поиск генов и аннотацию проводили с использованием сервера RAST (Brettin et al., 2015). Средство просмотра SEED использовалось для распределения предсказанных генов по категориям подсистем (Overbeek et al., 2014). Таксономическое положение штамма H1<sup>T</sup> уточняли двумя методами: средней идентичностью нуклеотидов (ANI), предоставленной калькулятором EzBioCloud ANI calculator (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>)

(Yoon et al., 2017) и *in silico* ДНК–ДНК гибридизацией, предоставленной калькулятором Genome-to-Genome Distance Calculator (<http://ggdc.dsmz.de>) (Meier-Kolthoff et al., 2013).

Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма Н1<sup>Т</sup> депонирована в GenBank/EMBL под номером MW872673.

Полногеномная последовательность штамма Н1<sup>Т</sup> депонирована в GenBank/EMBL под номером JAPFPW010000000.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Получение чистой культуры.** Накопительные культуры были получены путем внесения природного образца (около 10% об.) в стерильную анаэробную среду, содержащую пируват и сульфат. После инкубации накопительных культур при 30°C в течение 2 сут наблюдался значительный микробный рост. После трех последовательных пересевов (5% об.) культуру рассевали методом 10-кратных серийных разведений на жидкой среде того же состава. В последнем разведении, показавшем рост ( $10^{-8}$ ), наблюдался только один морфологический тип клеток. Десятикратные разведения были повторены еще дважды, и культура, выросшая в последнем разведении, получила обозначение штамм Н1<sup>Т</sup>. Результаты секвенирования гена 16S рРНК подтвердили чистоту культуры. Попытки получить рост колоний в анаэробных условиях на твердой среде методом roll-tube или в толще 1% Gelrite gellan gum или 1% агара, не привели к положительным результатам.

Клетки штамма Н1<sup>Т</sup> представляют собой вибрионы толщиной 1 мкм и длиной 2.0–2.5 мкм, растущие одиночно и подвижные за счет одиночного полярного жгутика. Образования эндоспор не наблюдалось на протяжении 30 сут культивирования.

**Физиология роста.** Штамм Н1<sup>Т</sup> 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 сут. Диапазон рН для роста составляет 8.5–10.5 (оптимум 9.5), роста не отмечалось при рН 8.0 и ниже или 11.0 и выше. Штамм Н1<sup>Т</sup> способен расти при концентрации NaCl в среде от 0.5 до 6.0% (вес/об.); при 7% NaCl и выше роста не наблюдалось.

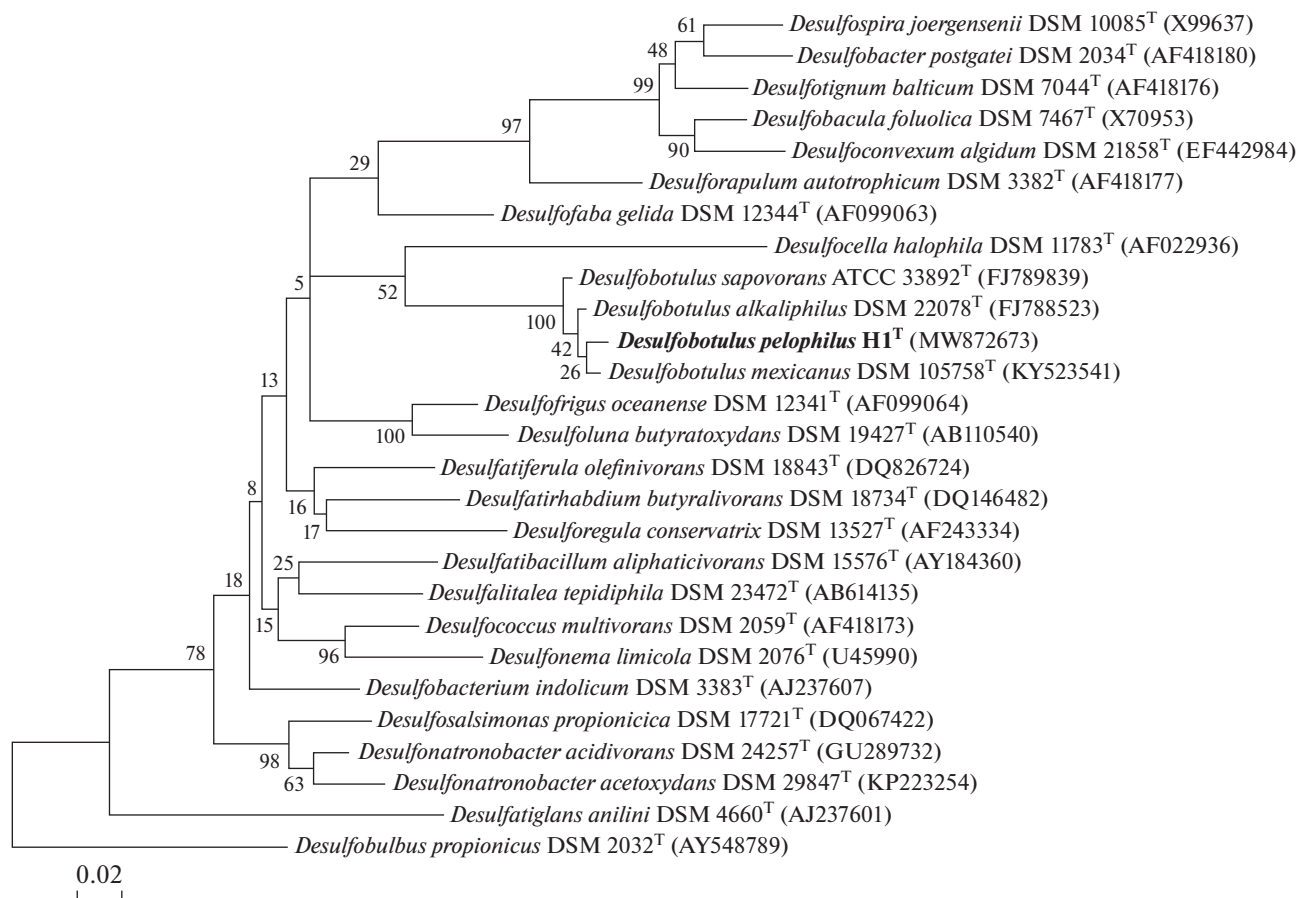
**Доноры и акцепторы электронов.** Штамм Н1<sup>Т</sup> способен использовать для роста органические кислоты в качестве доноров и соединения серы в качестве акцепторов электронов. Добавление дрожжевого экстракта (0.2 г/л) незначительно стимулировало рост, однако не являлось необходимым. Максимальная концентрация клеток (около  $5 \times 10^7$  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 Н1<sup>Т</sup> 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 ( $\text{H}_2 : \text{CO}_2$ , 80 : 20% в газовой фазе). Элементная сера (5 г/л), сульфит (10 мМ) и сульфат (14 мМ) использовались штаммом Н1<sup>Т</sup> 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 Н1<sup>Т</sup> в качестве акцепторов электронов в присутствии бутирата как донора электронов. Штамм Н1<sup>Т</sup> не способен к росту в аэробных и микроаэробных (до 3% кислорода) условиях.

Пируват и лактат (10 мМ каждый) сбраживались штаммом Н1<sup>Т</sup> с образованием ацетата и водорода в качестве конечных продуктов. Штамм Н1<sup>Т</sup> не сбраживал формиат, фумарат, цитрат, сукцинат, фруктозу, сахарозу, трегалозу, галактозу, ксилозу, пептон и дрожжевой экстракт в течение 3 нед. инкубации. Штамм Н1<sup>Т</sup> не способен к диспропорционированию элементной серы, тиосульфата и сульфита как в присутствии ферригидрита, служащего химической ловушкой для сульфида, так и в его отсутствие при культивировании в бутылки с большой газовой фазой.

**Состав клеточных жирных кислот.** Клеточные жирные кислоты штамма Н1<sup>Т</sup> были представлены смесью неразветвленных насыщенных и ненасыщенных кислот:  $\text{C}_{20:0}$  (54.2%),  $\text{C}_{22:0}$  (24.6%) и  $\text{C}_{18:0}$  (11.1%). Также были обнаружены  $\text{C}_{16:0}$  (3.8%),  $\text{C}_{24:0}$  (2.4%),  $\text{C}_{18:1} \omega 7\text{c}$  (2.2%) и  $\text{C}_{18:1} \omega 9\text{c}$  (1.8%).

**Филогения.** Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК штамма Н1<sup>Т</sup>, полученные путем амплификации с универсальными бактериальными праймерами и в ходе полногеномного секвенирования, были идентичны. Сравнение 1539 нуклеотидов последовательности гена 16S рРНК штамма Н1<sup>Т</sup> с нуклеотидными последовательностями, размещенными в базе данных GenBank (Benson et al., 1999), показали, что изолят



**Рис. 1.** Филогенетическое дерево, основанное на последовательностях гена 16S рРНК, показывающее положение штамма H1<sup>T</sup> 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. Масштабная метка – 0.020 замен на нуклеотидное положение. Идентификационные номера GenBank указаны в скобках.

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 H1<sup>T</sup> представляет собой монофилетическую ветвь, четко отделенную от наиболее близких видов (рис. 1).

Попарное сравнение средней нуклеотидной идентичности (ANI) генома штамма H1<sup>T</sup> и ближайшего родственного ему микроорганизма, *D. mexicanus* (DSM 105758<sup>T</sup>), составило 88.7%. Значение *in silico* ДНК–ДНК гибридизации H1<sup>T</sup> и *D. mexicanus* (DSM 105758<sup>T</sup>) по рекомендованной формуле 2 составляло 26.10%. Оба этих значения существенно ниже предлагаемого для прокариот порогового значения для разграничения на уровне видов, составляющего 95–96% (для ANI) и 70% (для ДНК–ДНК гибридизации) (Meier-Kolthoff et al., 2013, Rodriguez, Konstantinidis, 2016).

**Общие характеристики генома.** Геном штамма H1<sup>T</sup>, собранный из 86 контигов, имеет общую

длину 3656775 нт 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).

Геном штамма H1<sup>T</sup> содержит гены пути Эмбдена–Мейерхофа–Парнаса, включая NAD-зависимую глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (WP\_265423680), триозофосфат изомеразу (WP\_265423679), глюкозо-6-фосфат изомеразу (WP\_265426043), фосфоглицерат киназу (WP\_265423283), енолазу (WP\_265423752), пируваткиназу (WP\_265423750), 6-фосфофруктокиназу (WP\_265423438), фруктозо-бифосфаталядозу (WP\_265423362) и фосфоглицерат мутазу (WP\_265426113). Однако ген, кодирующий гексокиназу, катализирующую фосфорилирование

глюкозы на самой первой стадии гликолиза, отсутствует. Цикл трикарбоновых кислот в геноме штамма H1<sup>T</sup> закодирован не полностью, отсутствуют гены малатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы и сукцинил-КоА синтетазы.

Геном штамма H1<sup>T</sup> содержит полный набор генов, необходимых для осуществления процесса диссимиляционной сульфатредукции (Pereira et al., 2011), включая сульфат аденилилтрансферазу Sat (WP\_26542348), неорганическую пиррофосфатазу (WP\_265426333), AprA (WP\_265426087) и AprB (WP\_265426088) субъединицы APS редуктазы, компоненты диссимиляторной сульфитредуктазы DsrABCD (WP\_26542589–WP\_265425892) и электрон-переносящие комплексы DsrMKJOP и QmoABC (WP\_265425905–WP\_265425909).

В геноме штамма H1<sup>T</sup> были найдены два гена, кодирующие молибдоптериновую оксидоредуктазу (WP\_265423973 и WP\_265426274). Биохимическая функция этих ферментов не ясна. Вероятнее всего, они не являются каталитической субъединицей полисульфидредуктазы *psrA*, т.к. характерное для полисульфидредуктазы генное окружение для данных молибдоптериновых оксидоредуктаз в геноме штамма H1<sup>T</sup> отсутствует. Геном штамма H1<sup>T</sup> кодирует ферменты роданазу (WP\_265423671) и *hdr*-подобный комплекс с субъединицами *hdrA* (WP\_265423457), *hdrB* (WP\_265425454) и *hdrC* (WP\_265425453), которые участвуют в окислительно-восстановительных реакциях серных соединений, однако их биохимический механизм в настоящее время изучен недостаточно (Zhang et al., 2021).

В геноме штамма H1<sup>T</sup> содержатся все гены, необходимые для  $\beta$ -окисления жирных кислот, включая ацил-КоА дегидрогеназу (WP\_265423377, WP\_265423535, WP\_265424553, WP\_265424646, WP\_265425157, WP\_265425230, WP\_265425661, WP\_265425744, WP\_265426163), эноил-КоА гидратазу (WP\_265423968, WP\_265425159, WP\_265425648, WP\_265425692), 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназу (WP\_265423389, WP\_265425692) и 3-кетоацил-КоА тиолазу (WP\_265423278, WP\_265424057, WP\_265423533, WP\_265425693).

В геноме штамма H1<sup>T</sup> закодированы все компоненты нитрогеназного комплекса для фиксации молекулярного азота, включая Mo-Fe- и Fe-белки нитрогеназы *nifHDK* (WP\_265425310–WP\_265425314), а также белки, необходимые для ее сборки и регуляции: *nifENB* (WP\_265425306–WP\_265425309), *nifU* (WP\_26542406), *nifS* (WP\_265424064), *NifA* (WP\_265424773) и *NtrXY* (WP\_265425703–WP\_265425704).

Геном штамма H1<sup>T</sup> содержит гены каталазы (WP\_265425612), супероксиддисмутаза (WP\_265425250), хинолоксидазы *CydAB* (WP\_265424027–WP\_265424028), а также не-

сколько копий генов белков, участвующих в защите от окислительного стресса, таких как рубредоксин *Rbo* (WP\_265424029, WP\_265425910) и рубреритрин *Rbr* (WP\_265425583), которые, предположительно, выполняют эту функцию у *Desulfovibrio vulgaris* (Lumppio et al., 2001).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм H1<sup>T</sup> выделен из наземного грязевого вулкана Таманского полуострова. Он представляет собой анаэробную алкалофильную мезофильную сульфатвосстанавливающую бактерию.

Филогенетический анализ на основе гена 16S рРНК показал, что штамм H1<sup>T</sup> образует отдельную линию в пределах рода *Desulfobotulus* (Kuever et al., 2005), относящегося к семейству *Desulfobacteraceae* отряда *Desulfobacterales* филума *Pseudomonadota*. На момент публикации род *Desulfobotulus* представлен тремя видами с валидно опубликованными именами: *D. sapovorans* (Kuever et al., 2005), *D. alkaliphilus* (Sorokin et al., 2010) и *D. mexicanus* (Pérez-Bernal et al., 2020). Идентичность нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК между штаммом H1<sup>T</sup> и *D. mexicanus* (DSM 105758<sup>T</sup>) составляет 98.31%. Попарные сравнения средней нуклеотидной идентичности (ANI) и *in silico* ДНК–ДНК гибридизации между штаммом H1<sup>T</sup> и *D. mexicanus* (DSM 105758<sup>T</sup>) также позволяющие отнести изолят к новому виду рода *Desulfobotulus*.

Представители рода *Desulfobotulus* широко географически распространены. Они были обнаружены в разнообразных экосистемах, включая пресноводные местообитания и щелочные содовые или кратерные озера (GBIF Secretariat (2021); GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei>). Штамм H1<sup>T</sup> 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<sup>T</sup>, соответствует фенотипическим данным. Для всех видов рода *Desulfobotulus* характерно использование алифатических жирных кислот в процессе диссимиляционной сульфатредукции. Дифференцирующие характеристики штамма H1<sup>T</sup> и членов рода *Desulfobotulus* представлены в табл. 1. Наиболее заметными отличиями являются более высокий температурный оптимум и способность сбраживать лактат. Таким образом, на основании проведенных исследований мы предлагаем отнести штамм H1<sup>T</sup> к новому виду рода *Desulfobotulus* – *Desulfobotulus pelophilus* sp. nov.

**Таблица 1.** Дифференцирующие характеристики штамма H1<sup>T</sup> и других видов рода *Desulfobotulus*. Все штаммы используют пируват в качестве донора электронов и сульфат и сульфит в качестве акцептора электронов. Н.д. – данные в литературных источниках отсутствуют

| Характеристика            | H1 <sup>T</sup> (настоящее исследование)                          | <i>D. mexicanus</i> (Pérez-Bernal et al., 2020)                                                                          | <i>D. alkaliphilus</i> (Sorokin et al., 2010)                     | <i>D. sapovorans</i> (Kuever et al., 2005) |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| $T_{\text{опт}}$ , °C     | 37                                                                | 32                                                                                                                       | 32                                                                | 34                                         |
| pH 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            | C <sub>4</sub> , C <sub>6</sub> , C <sub>8</sub> , C <sub>9</sub> | C <sub>4</sub> , C <sub>6</sub> , C <sub>8</sub> , C <sub>10</sub> , C <sub>14</sub> , C <sub>16</sub> , C <sub>18</sub> | C <sub>4</sub> , C <sub>6</sub> , C <sub>8</sub> , C <sub>9</sub> | C <sub>4</sub> –C <sub>16(18)</sub>        |
| 2-Метилбутират            | –                                                                 | +                                                                                                                        | –                                                                 | +                                          |
| Лактат                    | +                                                                 | –                                                                                                                        | –                                                                 | +                                          |
| Акцепторы электронов      |                                                                   |                                                                                                                          |                                                                   |                                            |
| Тиосульфат                | +                                                                 | –                                                                                                                        | +                                                                 | –                                          |
| Элементная сера           | +                                                                 | +                                                                                                                        | +                                                                 | –                                          |
| Брожение                  |                                                                   |                                                                                                                          |                                                                   |                                            |
| Лактат                    | +                                                                 | Н.д.                                                                                                                     | Н.д.                                                              | –                                          |
| Пируват                   | +                                                                 | –                                                                                                                        | +                                                                 | +                                          |
| Содержание Г + Ц (мол. %) | 51.1                                                              | 49.0                                                                                                                     | 51.3                                                              | 53                                         |
| Источник выделения        | Наземный<br>грязевой вулкан                                       | Содовое озеро                                                                                                            | Содовое озеро                                                     | Пресный водоем                             |

### Описание *Desulfobotulus pelophilus* sp. nov.

*Desulfobotulus pelophilus* (pe.lo'phi.lus. Гр. муж. суш. *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°C (оптимум – 37°C), pH 8.5–10.5 (оптимум – 9.5), 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 C<sub>20:0</sub>, C<sub>22:0</sub> и C<sub>18:0</sub>.

Типовой штамм H1<sup>T</sup> (=DSM 112796<sup>T</sup> = VKM B-3697<sup>T</sup> = UQM 41590<sup>T</sup>) выделен из наземного грязевого вулкана полуострова Тамань. Размер генома – 3.66 Мп. Содержание Г + Ц в геномной ДНК 51.1% (полногеномное секвенирование).

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 22-14-00011 (выделение, определение физиологических характеристик и таксономического положения изолята). Секвенирование полного генома и биоинформатический анализ проведены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ. Состав жирных кислот определен в Губкинском университете при поддержке стипендии Президента РФ (СП-4709.2022.1).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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.
- Холодов В.Н. Грязевые вулканы: распространение и генезис // Геология и полезные ископаемые мирового океана. 2012. Т. 4. С. 5–27.

- 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. P. 574–590.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. P. 403–410.
- Benson D.A., Boguski M.S., Lipman D.J., Ostell J., Ouellette B.F.F., Rapp B.A., Wheeler D.L. GenBank // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. P. 12–17.
- 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., 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. P. 8365.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // *Evolution.* 1985. V. 39. P. 783–791.
- Frolova A.A., Merkel A.Y., 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.
- Frolova A.A., Merkel A.Y., 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.
- GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset. <https://doi.org/10.15468/39omei>
- Khomyakova 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* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 4914–4919.
- 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 // *Syst. Appl. Microbiol.* 2022. V. 45. Art. 126304.
- Knittel K., Boetius A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process // *Annu. Rev. Microbiol.* 2009. V. 63. P. 311–334. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093130>
- Kuever J., Rainey F.A., Widdel F. Class IV. *Deltaproteobacteria* class nov. // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / Eds. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. Boston, MA: Springer, 2005. P. 970–971.
- Kuever J., Rainey F.A., Widdel F. *Desulfobacterales* ord. nov. // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* / Eds. Trujillo M.E., Dedysh S., DeVos P., Hedlund B., Kämpfer P., Rainey F.A. and Whitman W.B. 2015. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.obm00084>
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. P. 1870–1874.
- 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. P. 101–108. Erratum in: *J. Bacteriol.* 2001 May; 183 (9): PMID: 11114906; PMID: PMC94855. <https://doi.org/10.1128/JB.183.1.101-108.2001>
- Mazzini A., Etiope G. Mud volcanism: an updated review // *Earth-Science Rev.* 2017. V. 168. P. 81–112.
- 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 Bioinform.* 2013. V. 14. Art. 60.
- Merkel A.Y., Chernyh N.A., Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. 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. Art. 953.
- Overbeek R., Olson R., Push 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. I. D1. P. D206–D214.
- Parte A.C., Sardà Carbasse J., Meier-Kolthoff J.P., Reimer L.C., Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 5607–5612. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>
- 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. P. 69. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00069>
- 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 // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 3219–3225. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004159>
- 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. P. 2370–2385.
- Rodriguez-R L.M., Konstantinidis K.T. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes // *PeerJ Preprints.* 2016. 4:e1900v1.
- Slobodkin A.I., Reysenbach A.-L., Slobodkina G.B., Baslerov R.V., Kostrikina N.A., Wagner I.D., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Thermosulfurimonas dismutans* gen. nov., sp. nov., a novel extremely thermophilic sulfur-disproportionating bacterium from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 2565–2571.
- Slobodkina G.B., Merkel A.Y., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *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. P. 177–185. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01145-0>
- 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. P. 71–77.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4876–4882.

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. P. 225–238.

<https://doi.org/10.1007/BF02046728>

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. Art. 2137.

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // *J. Bacteriol.* 1991. V. 173. P. 697–703.

Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. Formation of methane // *J. Franklin Inst.* 1963. V. 176. P. 737.

Yoon S.H., Ha S.-M., Lim J., Kwon S., Chun J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2017. V. 110. P. 1281–1286.

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 Research*. 2021. V. 202. Art. 117373.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117373>

## *Desulfobotulus pelophilus* sp. nov., an Alkaliphilic Sulfate-Reducing Bacterium from a Terrestrial Mud Volcano

A. A. Frolova<sup>1</sup>, \*, A. Yu. Merkel<sup>1</sup>, A. A. Kuchierskaya<sup>1</sup>, and A. I. Slobodkin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: romana2804@gmail.com

Received March 3, 2023; revised March 24, 2023; accepted March 25, 2023

**Abstract**—An alkaliphilic, sulfate-reducing, anaerobic bacterium (strain H1<sup>T</sup>) was isolated from a terrestrial mud volcano at the Taman Peninsula, Russia. The cells of the isolate were gram-negative motile vibrios, 1 µm in diameter and 2.0–2.5 µm in length. Strain H1<sup>T</sup> grew at 14–42°C (optimum at 37°C), pH 8.5–10.5 (optimum at pH 9.5), and NaCl concentrations of 0.5–6% (wt/vol) (optimum at 0.5–1.5%); pyruvate, lactate, butyrate, caproate, or pelargonate were used as electron donors, and elemental sulfur, sulfite, or sulfate were used as electron acceptors. Pyruvate and lactate were fermented. No growth occurred in the presence of oxygen. Thiosulfate, DMSO, fumarate, nitrate, nitrite, arsenate, selenite, and Fe(III) were not used as electron acceptors. Elemental sulfur, thiosulfate, and sulfite were not disproportionated. Glucose, fructose, sucrose, trehalose, galactose, xylose, fumarate, citrate, yeast extract, and peptone were not fermented. Predominant fatty acids were C<sub>20:0</sub> (54.2%), C<sub>22:0</sub> (24.6%), and C<sub>18:0</sub> (11.1%). The genome of strain H1<sup>T</sup> was 3.66 Mb in size and had G + C DNA content of 51.1%. The genome contained the genes encoding the enzymes of dissimilatory sulfate reduction and β-oxidation of fatty acids. According to the results of analysis of the 16S rRNA gene sequence, *Desulfobotulus mexicanus* was the organism most closely related to strain H1<sup>T</sup> (98.3% similarity). Based on its phenotypic characteristics and the data of phylogenetic analysis, affiliation of the isolate as member of a novel *Desulfobotulus* species, *Desulfobotulus pelophilus* sp. nov., is proposed, with the type strain H1<sup>T</sup> (=DSM 112796<sup>T</sup> = VKM B-3697<sup>T</sup> = UQM 41590<sup>T</sup>).

**Keywords:** alkaliphile, sulfate reduction, anaerobic bacteria, mud volcano, *Desulfobacterales*