ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-3-2384
https://elibrary.ru/RZBSPB

Оригинальная статья
https://fptt.ru

Филогенетическое разнообразие микроорганизмов источника Абаканский Аржан – потенциальных продуцентов микробной энергии

А. И. Дмитриева[1,*], Е. Р. Фасхутдинова[1], М. Ю. Дроздова[1], С. С. Кутузов[2], Л. А. Проскурякова[1]

[1] *Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия*

[2] *Средняя общеобразовательная школа № 34, Краснобродский, Россия*

Поступила в редакцию: 22.03.2022
Принята после рецензирования: 20.04.2022
Принята к публикации: 04.05.2022

**А. И. Дмитриева: a_piskaeva@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-8764-4049*
Е. Р. Фасхутдинова: https://orcid.org/0000-0001-9711-2145
М. Ю. Дроздова: https://orcid.org/0000-0002-9499-9470
С. С. Кутузов: https://orcid.org/0000-0001-8807-5573
Л. А. Проскурякова: https://orcid.org/0000-0002-9583-9161

© А. И. Дмитриева, Е. Р. Фасхутдинова, М. Ю. Дроздова, С. С. Кутузов, Л. А. Проскурякова, 2022

Аннотация.
Микробная энергия – одно из перспективных направлений инновационных разработок в области био- и нанотехнологий. Результаты многочисленных исследований последних лет показывают, что микробное сообщество термальных источников представляет особый интерес в данном направлении. Цель исследования – изучение микробного разнообразия сообществ термального источника Абаканский Аржан для выявления и идентификации изолятов, потенциально применимых в технологиях микробного синтеза электроэнергии.
Объектами исследования являлись микробные изоляты, полученные в результате анализа микробиоты образцов воды и ила термального источника Абаканский Аржан. Проведены метагеномный анализ микробного сообщества и сравнение последовательностей 16S РНК с использованием библиотеки Silva. Анализ изолятов проводили с помощью экстракции нуклеиновых кислот. Применяли методы ПЦР и секвенирования, а также филогенетический и биоинформатический анализ.
Доминирующими филотипами для проб воды являются *Firmicutes*, *Bacteroides* и *Proteobacteria*, для проб ила – *Firmicutes*, *Thermomonas*, *Gammaproteobacteria* и *Proteobacteria*. Анализ минорных филотипов подтвердил присутствие в пробах *Geobacter* и *Shewanella*. Общее количество полученных накопительных культур – 9. В ходе работ по выделению экстремофильных железоредуцирующих изолятов получено два вида устойчивых колоний. Рост на среде, содержащей ацетат железа (III) и нитрат железа (III), свидетельствует о процессе Fe(III)-восстановления у исследуемых изолятов. Изоляты показали интенсивное восстановление железа после 72 ч культивирования: 409 и 407 мкг/мл.
Полученные изоляты способны к железоредукции, что делает их приоритетными для исследований с целью получения микробной энергии. Показано, что изоляты относятся к видам *Shewanella algae* и *Geobacter sulfurreducens*, что подтверждается результатами морфологического и филогенетического анализа 16S РНК.

Ключевые слова. Микробная энергия, микробный электросинтез, микробный топливный элемент, экстремофильные микроорганизмы, микробиота, термальный источник

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Минобрнауки России) (стипендия Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики на 2021–2023 гг., приказ Минобрнауки России от 26.01.2021 № 54). Тема проекта «Энергоэффективная экологически чистая технология получения электроэнергии с использованием биомассы термальных источников».

Для цитирования: Филогенетическое разнообразие микроорганизмов источника Абаканский Аржан – потенциальных продуцентов микробной энергии / А. И. Дмитриева [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2022. Т. 52. № 3. С. 458–468. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-3-2384

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-3-2384
https://elibrary.ru/RZBSPB

Original article
Available online at https://fptt.ru/en

Phylogenetic Diversity of Microorganisms from the Abakan Arzhan Thermal Spring: Potential Producers of Microbial Energy

Anastasiya I. Dmitrieva[1,*], Elizaveta R. Faskhutdinova[1], Margarita Yu. Drozdova[1], Sergei S. Kutuzov[2], Larisa A. Proskuryakova[1]

[1] *Kemerovo State University, Kemerovo, Russia*

[2] *Middle School of General Education №34, Krasnobrodsky, Russia*

Received: 22.03.2021
Revised: 20.04.2022
Accepted: 04.05.2022

**Anastasiya I. Dmitrieva: a_piskaeva@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-8764-4049*
Elizaveta R. Faskhutdinova: https://orcid.org/0000-0001-9711-2145
Margarita Yu. Drozdova: https://orcid.org/0000-0002-9499-9470
Sergei S. Kutuzov: https://orcid.org/0000-0001-8807-5573
Larisa A. Proskuryakova: https://orcid.org/0000-0002-9583-9161

© A.I. Dmitrieva, E.R. Faskhutdinova, M.Yu. Drozdova, S.S. Kutuzov, L.A. Proskuryakova, 2022

Abstract.
Microbial energy is a promising area of innovative development in bio- and nanotechnology. Recent studies have revealed that microbial communities of thermal springs have excellent implementation prospects in this area. The present article introduces the microbial diversity of the Abakan Arzhan thermal spring and their isolates that are potentially applicable in microbial electricity synthesis.
The research featured microbial isolates obtained from a microbiota analysis of water and slit samples from the Abakan Arzhan thermal spring. The study involved a metagenomic analysis of the microbial community, as well as such molecular biology methods as nucleic acid extraction, PCR, sequencing, phylogenetic, and bioinformatic analysis. The Silva library was used to compare 16S RNA sequences
Firmicutes, *Bacteroides*, and *Proteobacteria* proved to be the dominant phylotypes for water samples, while *Firmicutes*, *Thermomonas*, *Gammaproteobacteria*, and *Proteobacteria* were the dominant phylotypes for slit samples. The analysis of minor phylotypes confirmed the presence of *Geobacter* and *Shewanella* in the samples. The total number of obtained enrichment cultures was nine. Two types of resistant colonies were discovered during the isolation of extremophilic iron-reducing isolates. The samples were grown on a medium containing iron (III) acetate and iron (III) nitrate, and the isolates appeared to be in the process of Fe(III) reduction. The isolates showed an intense iron recovery of 409 and 407 µg/mL after 72 h of cultivation. The study confirmed the ability of the acquired isolates to reduce iron, making them a priority for future microbial energy research. The isolates belonged to the *Shewanella* algae and *Geobacter sulfurreducens* species, as determined by 16S RNA morphology and phylogenetic analyses.

Keywords. Microbial energy, microbial electrosynthesis, microbial fuel cell, extremophilic microorganisms, microbiota, thermal springs

Funding. The research was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Minobrnauka) as part of the Grant of the President of the Russian Federation for young scientists and postgraduate students working in priority areas of modernization of the Russian economy (SP 2021–2023), project topic: “Energy-efficient environmentally friendly technology for generating electricity from thermal spring biomass”.

For citation: Dmitrieva AI, Faskhutdinova ER, Drozdova MYu, Kutuzov SS, Proskuryakova LA. Phylogenetic Diversity of Microorganisms from the Abakan Arzhan Thermal Spring: Potential Producers of Microbial Energy. Food Processing: Techniques and Technology. 2022;52(3):458–468. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-3-2384

Введение

Горячий источник Абаканский Аржан находится в Таштыпском районе республики Хакасия (51°47’53.9»N 88°15’01.1»E). Согласно гидрохимическим и геоструктурным исследованиям воды источника кремнистые, имеют нейтральный pH 7,2 и температуру 37–40 °C [1, 2]. Т. А. Олигер исследовал химический состав воды источника Абаканский Аржан (табл. 1) [3].

На большое содержание кремниевых кислот в составе оказывает влияние температура и давление. Содержание кремниевых кислот выше 100 мг/л характерно для высокотермальных вод с температурой > 70 °C [1].

Экстремофилы – это микроорганизмы, способные жить и размножаться в экстремальных условиях среды. Существует множество классов экстремофилов, классифицированные по условиям окружающей среды. В отношении микробного набора термальных источников можно выделить наиболее изученные рода, среди которых экстремофильные прокариоты-деструкторы водорода, сероводорода, метана и других простых газов, а также сложных полимеров [4, 5].

Данные об изучении микробиоты источника Абаканский Аржан отсутствуют. Однако, согласно существующим исследованиям, термальные источники со схожим химическим составом обладают уникальным микробным сообществом, отдельные представители которого могут использоваться для создания микробных топливных элементов с целью получения чистой энергии [5–8]. Микробные топливные элементы – это биоэлектрическая система, включающая анод и катод, разделенные специальной мембраной, и применяющаяся с целью получения электроэнергии по средствам окисления субстрата, находящегося в камере, с помощью микроорганизмов. Это перспективные и безопасные источники энергии.

Таблица 1. Химический состав воды источника Абаканский Аржан
Table 1. Chemical composition of water from the Abakan Arzhan spring

Элемент	Содержание		
	мг/л	мг-экв/л	экв-%
Калий	2,00 ± 0,10	0,05 ± 0,01	1,00 ± 0,10
Натрий	30,00 ± 0,50	1,33 ± 0,10	29,00 ± 0,50
Магний	12,00 ± 0,30	1,00 ± 0,30	22,00 ± 0,45
Кальций	43,00 ± 0,60	2,10 ± 0,10	47,00 ± 0,60
Фтор	–	–	–
Хлор	21,00 ± 0,40	0,60 ± 0,05	13,00 ± 0,25
Оксид серы	21,00 ± 0,40	0,45 ± 0,60	10,00 ± 0,20
Гидрокарбонаты	214,00 ± 0,90	3,52 ± 0,15	77,00 ± 0,70
Кремниевые кислоты	75,00 ± 0,70	–	–
Минерализация	422,00 ± 0,80	–	–

Данные установки схожи в техническом исполнении и применяемых материалах. Основой установок является камера или цилиндр, содержащие питательную среду или субстрат. Зависит это от штаммов микроорганизмов, которые применяются в технологии, а также от цели культивирования.

Общий принцип работы микробных топливных элементов заключается в анаэробном окислении субстрата биологическим материалом в анодной камере, отделенной от катодной ионоселективной мембраной. В результате микроорганизмы отдают на анод электроны различными способами. Из-за перехода ионов, имеющих положительный заряд, в катодную область и скапливании электронов на аноде возникает разность потенциалов, генерирующая электрический ток. Мембрана представляет собой небольшой канал, который сужается посередине и находится между катодной и анодной камерами. Она не дает смешиваться средам в камерах. Таким образом, в анодной камере происходит окисление, а в катодной восстановление [9, 10].

Электроны в микробных топливных элементах образуются в процессе сложных биохимических реакций, которые катализируются бактериями [6, 11]. Выбор биокатализатора зависит от субстрата, который определяет мощность и эффективность микробных топливных элементов. Исследовано микробное сообщество бактерий, которое вырабатывало до 0,3 мА [12]. Бактерии, идентифицированные S. Ishii и др. как относящиеся к роду *Rhizobiales*, составляли основную популяцию микробных топливных элементов, в котором в качестве единственного источника углерода выступала целлюлоза. Учеными отмечалась уникальная морфология исследуемых изолятов: наличие нитевидных придатков, которые играют важную роль в электрогенном сообществе, разлагающем целлюлозу. H. Rismani-Yazdi и др. для выработки энергии использовали микробное сообщество, выделенное из рубца крупного рогатого скота [13]. В результате удалось достичь силы тока в 1,5 мА. Однако генерируемая мощность микробных топливных элементов на основе подобных микробных сообществ низкая.

Интересными представляются результаты работ, авторы которых использовали бактерии, восстанавливающие металлы в качестве биокатализаторов в микробных топливных элементах. К таким относят *Geobacter*, *Shewanella*, *Rhodopseudomonas*, *Clostridium* и др. [14–24].

Серия исследований показала, что *Geobacter* и *Shewanella* используют электропроводящие внеклеточные нити (нанопроволока) для переноса электронов на твердые акцепторы, такие как графитовые аноды. Механизм переноса электронов хорошо изучен именно на примере указанных родов. Данные микроорганизмы признаны модельными объектами при исследовании микробного

электросинтеза и металлоредукции [12, 25, 26]. В основе переноса электронов ключевую роль играют мультигемовые цитохромы. Это белки, которые обеспечивают перенос электронов от цитоплазматической мембраны бактериальной клетки на внешнюю оболочку [27, 28]. Однако многие базовые вопросы, касающиеся микробиологии генерации электричества (микробного электросинтеза), до сих пор остаются без ответа.

Микробные топливные элементы для производства электроэнергии позволяют использовать разнообразные субстраты: от чистых соединений до сложных смесей органических веществ, присутствующих в сточных водах. Субстрат включает в себя как органические, так и неорганические материалы. Существует множество субстратов, на которых могут расти экстремофильные бактерии [14, 16, 18, 27]. Однако ученые сходятся во мнении, что выращивать такие штаммы в лабораторных условиях сложно, т. к. эволюционно сообщества данных бактерий выживали в среде с недостатком водорода и кислорода, поэтому их использование и культивирование в лабораторных условиях требует тщательного подхода и понимания факторов конкурентной борьбы микробиологических сообществ за энергию [7, 14]. В лабораториях применяются методы, которые предполагают выращивание больших партий клеток и измерение активности белков. Это сложный и трудоемкий процесс. Другие методы основаны на разрушении клеточных структур, очистке и исследовании белков [18, 27, 28].

В качестве питательной среды для таких штаммов учеными предлагается использовать либо стандартные лабораторные среды, либо отходы, содержащие органические соединения [3, 4, 13, 17].

Целью настоящей работы является выявление и анализ бактериальных изолятов источника Абаканский Аржан для поиска ключевых продуцентов микробной энергии.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись образцы воды и ила термального источника Абаканский Аржан (Россия, Республика Хакасия, Таштыпский район, 51°47›53.9»N 88°15›01.1»E) и полученные на следующих этапах исследования бактериальные изоляты.

Сбор образцов проводили в августе – сентябре 2020 г. Пробы по 25 г ила и 25 мл воды отбирали в стерильные контейнеры. Площадь отбора одной точки составляла от 10 до 30 см^2. Глубина отбора от 10–30 см ниже уровня донных отложений (табл. 2). Каждый отбор производили в 3-х повторностях.

Герметичные контейнеры с образцами хранили при температуре 4,0 ± 0,5 °C до доставки в лабораторию.

Для получения накопительных культур изолятов готовили 10 % суспензии образцов и высевали на минимальные питательные среды. В качестве источника углерода и донора электронов в минимальных питательных средах использовали 10 мМ ацетата, а также 40 мМ фумарата в качестве акцептора электронов.

Общую микробную численность определяли методом Коха. Чашки Петри инкубировали при температуре 37 °C в течение 72 ч. Учитывали число колоний, вырастающих при посеве 1 мл пробы на чашку Петри.

Морфологию изолятов, наличие пилей и чехла наблюдали с помощью электронного микроскопа (Carl Zeiss, Германия) по стандартным методикам [29, 30]. Также применяли люминесцентную микроскопию на инверсионном микроскопе AxioVert.A1 (Carl Zeiss, Германия) с применением красителя акридинового оранжевого.

Для выявления термотолерантных и экстремофильных изолятов чашки Петри инкубировали при значениях температуры 30–60 °C с шагом 5 °C. Оптимум pH для изолятов определяли по методике измерения удельной скорости роста изолята.

Выделенные изоляты подвергали консервации при температуре –80 °C.

Для выявления способности будущих изолятов к железоредукции использовали среды, которые содержат $Fe(CH_3COO)_3$ и $Fe(NO_3)_3$, впервые предложенные профессором D. RLovley для выращивания железоредуцирующих бактерий, усовершенствованные в последующем [31]. Дополнительно к среде добавляли витамины, микроэлементы и дрожжевой экстракт [32]. Инкубировали при 37,0 ± 0,5 °C в течение 72 ч, строго соблюдая анаэробные условия CO_2 в инкубаторе ИЛМ-170-01 (Lamsystems, Россия).

Методику определения способности штаммов к железоредукции подробно описали C. Merino и др. [33]. Авторы использовали фотоколориметрический метод, основанный на определении количества ионов железа (II). Для этого в 500 мкл среды, содержащей

Таблица 2. Схема отбора образцов из источника Абаканский Аржан
Table 2. Sampling scheme from the Abakan Arzhan spring

№	Тип образца	Объем/масса	Глубина отбора (для ила от уровня донных отложений), см	pH	Температура, °C
1	Вода	25 мл	30	6,8	26,5
2	Вода	25 мл	100	6,9	37,8
3	Вода	25 мл	300	7,2	40,0
4	Ил	25 г	10	7,1	25,5
5	Ил	25 г	20	7,2	30,0
6	Ил	25 г	30	7,5	31,7

суспензию изолятов, вносили равное количество *α,ά*-дипиридила. Доводили объем до 3 мл и выдерживали в темном месте в течение 30 мин. После образцы исследовали на фотоэлектроколориметре при длине волны 540 нм и определяли концентрацию ионов Fe^{2+} в мг/л с помощью построения калибровочного графика.

Для метагеномного анализа микробного сообщества экстрагировали нуклеиновые кислоты из образцов с использованием наборов DNEasy PowerSoil Kit и RNeasy PowerSoil Total RNA Kit (Qiagen, Германия). Выделение проводили согласно протоколам производителя.

Для экстракции нуклеиновых кислот из накопительных культур использовали наборы DNEasy Kit и RNeasy Kit (Qiagen, Германия). Выделение проводили согласно протоколам производителя.

Качество выделенных нуклеиновых кислот и оценку целостности РНК определяли на системе капиллярного электрофореза с автосемплером на 8 образцов Qsep1 (Bioptic, Тайвань).

Амплификацию выделенных фрагментов проводили прямым методов, согласно протоколу, описанному G. Muyizer с коллегами [34].

Для амплификации 16 S РНК использовали праймеры 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) и 1525R (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC) [30, 35].

Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе АНК-32 (Синтол, Россия) в режиме реального времени при следующих условиях: цикл при 94 °C для денатурации двуцепочечной молекулы ДНК в течение 5 мин, затем 30 циклов при 95 °C в течение 0,5 мин, 55 °C в течение 0,5 мин, 72 °C в течение 1,5 мин и заключительный этап удлинения при 72 °C в течение 10 мин. Для рестрикции использовали HaeIII, HhaI, MnlI, Sau3AI, TaqI.

Секвенирование нуклеотидных последовательностей проводили на платформе MiSeq (Illumina, США) с применением NGS технологий. Для работы использовали готовый набор реагентов от производителя Reagent Kit v3 (Illumina, США). Работу вели по протоколам прибора с незначительными модификациями.

Биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей 16S рРНК проводили по базе данных NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov), используя алгоритм BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov). В случае необходимости проводили редактирование полученных последовательностей с помощью BioEdit (http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html).

Для анализа 16S РНК микробиотического сообщества использовали библиотеку Silva (https://www.arb-silva.de), где представлены комплексные, проверенные на качество и регулярно обновляемые наборы данных выровненных последовательностей малых (16S/18S, SSU) и больших субъединиц (23S/28S, LSU) рибосомных РНК (рРНК) для трех доменов: бактерии, археи и эукариоты [36].

Филогенетический анализ проводили с использованием программы MEGA11 (https://www.megasoftware.net).

Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам с использованием

Таблица 3. Разнообразие представителей таксона *Bacteria* в пробах воды и ила

Table 3. Bacterial diversity in water and silt samples

Номер пробы	1	2	3	4	5	6
Филотип	Процент от общего числа последовательностей в библиотеке, %					
Firmicutes	34,674	23,456	54,254	34,567	29,755	13,194
Bacteroides	14,973	9,082	11,493	2,973	3,083	2,194
Thiobacillus	–	–	–	–	–	1,038
Betaproteobacteria	–	–	–	0,234	6,234	25,992
Thermomonas	0,274	3,682	10,763	15,972	17,254	45,723
Gammaproteobacteria	–	–	3,742	10,234	10,422	16,274
Proteobacteria	56,962	48,862	36,872	62,722	45,724	33,834
Actinobacteria	–	–	3,761	5,621	–	10,672
Минорные филотипы	Процент от общего числа последовательностей в библиотеке, %					
Sulfurospirillum	–	–	–	0,001	–	–
Geobacter	0,001	0,001	0,004	0,001	0,029	0,085
Shewanella	–	–	0,001	0,003	0,078	0,098
Pseudomonas	–	0,001	0,001	–	–	–
Achromobacter	–	–	0,001	–	–	0,001
Clostridium	–	–	–	–	–	–

программного пакета Microsoft Excel 2010 для Windows 7. Для полученных данных рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение.

Результаты и их обсуждение

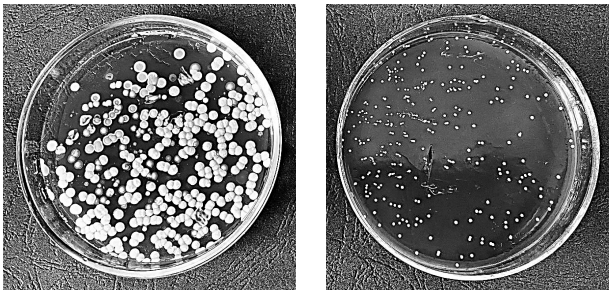
Результаты исследования бактериального разнообразия филотипов в образцах воды и ила приведены в таблице 3.

В таблице 3 представлены данные по филотипам, для которых средний процент находки выше 1 %. Доминирующими филотипами, которые удалось установить, для проб воды являются *Firmicutes*, *Bacteroides и Proteobacteria*, для проб ила – *Firmicutes*, *Thermomonas*, *Gammaproteobacteria* и *Proteobacteria*.

С целью упрощения поиска железоредуцирующих изолятов был произведен анализ минорных филотипов, который подтвердил присутствие в пробах РНК *Geobacter* и *Shewanella*, в меньшем количестве – *Pseudomonas*, *Sulfurospirillum* и *Achromobacter*.

Общее количество полученных накопительных культур из образцов, собранных на источнике Абаканский Аржан, – 9. Данные исследования морфологических и физиологических свойств представлены в таблице 4.

В ходе изучения морфологических и физиологических характеристик изолятов интересными с точки зрения дальнейших исследований представляются изоляты № 1 и 2. Данные представители микробиоты термального источника Абаканский Аржан обладают выраженными экстремофильными свойствами: рост на среде с pH 8,0–8,5, рост при температуре 40 ± 2 и 45 ± 2 °C соответственно. На рисунке 1 представлены два вида устойчивых колонии (изоляты № 1 и 2) на плотной питательной среде. Состав указан в [31].



Изолят № 1 Изолят № 2

Рисунок 1. Изоляты, полученные на среде, содержащей $Fe(CH_3COO)_3$ и $Fe(NO_3)_3$. Изображение колоний после 48 ч инкубации

Figure 1. Isolates obtained on a medium containing $Fe(CH_3COO)_3$ and $Fe(NO_3)_3$ after 48 h of incubation

Морфологические характеристики изолятов представлены на рисунке 2.

Оба изолята на разных стадиях роста имели палочковидную форму. Средняя длина и ширина клеток изолята № 1 составила 4,50 ± 0,08 и 0,80 ± 0,03 мкм, изолят № 2 обладал средней длиной и шириной – 2,20 ± 0,05 и 0,60 ± 0,02 мкм соответственно. Для изолята № 2 наблюдалось незначительное образование диплолочковидных клеток при переходе

Таблица 4. Морфологические и физиологические свойства изолятов

Table 4. Morphological and physiological properties of isolates

Изолят / Свойства	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9
Длина клетки, мкм	4,50 ± 0,08	2,20 ± 0,05	0,80 ± 0,01	2,80 ± 0,02	3,20 ± 0,06	1,90 ± 0,01	0,70 ± 0,01	2,70 ± 0,05	2,20 ± 0,05
Наличие чехла	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Оптимальное значение pH	8,0–8,5	8,0–8,5	7,0–8,0	7,0–8,0	6,0–6,5	7,0–8,0	7,5–8,5	7,0–8,0	7,0–8,0
Оптимальная температура, °C	40 ± 2	45 ± 2	35 ± 2	33 ± 2	37 ± 2	36 ± 2	33 ± 2	37 ± 2	37 ± 2
Аэробный рост в темноте	+	+	+	–	–	–	+	+	–
Наличие пилей	+	+	–	–	±	–	±	–	–

«+» – присутствие признака; «–» – отсутствие признака; «±» – сомнительный признак.
“+” – sign detected; “–” – no sign detected; “±” – a doubtful sign

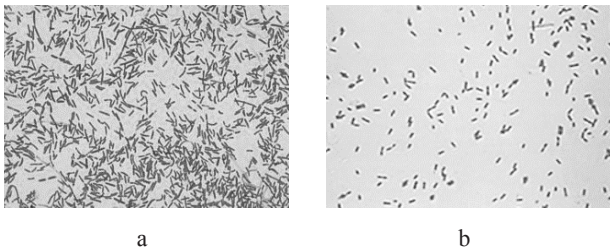


Рисунок 2. Морфология изолятов в логарифмической стадии роста культур: a – изолят № 1; b – изолят № 2. Данные электронной микроскопии, ×100

Figure 2. Morphology of isolates in the logarithmic stage of culture growth: a – isolate 1; b – isolate 2. Electron microscopy, ×100

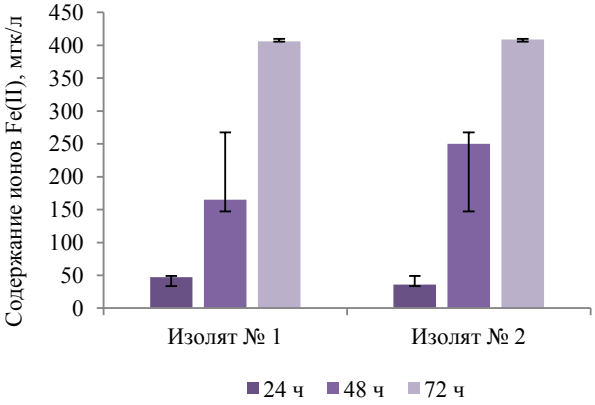


Рисунок 3. Зависимость содержания ионов Fe(II) от изолята и продолжительности культивирования

Figure 3. Effect of isolate and cultivation time on the content of Fe(II) ions

в экспоненциальную стадию роста. Подобные клетки представляют собой недавно разделившиеся клетки.

Рост на среде, содержащей ацетат железа (III) и нитрат железа (III), свидетельствует о процессе Fe(III)-восстановления у исследуемых изолятов. На рисунке 3 представлено содержание ионов Fe(II), мкг/мл, в зависимости от изолята.

Очевидны железоредуцирующие свойства выделенных изолятов. С увеличением времени культивирования содержание ионов железа значительно повышается. Это связано с процессом Fe(III)-восстановления в исследуемых образцах. На графиках роста содержания ионов Fe(II) заметны статистические отклонения, которые появляются через 48 ч культивирования. Авторы объясняют это отличиями в способности штаммов к железоредукции. Интенсивнее восстановление железа проходит в образце с изолятом № 2 после 72 ч культивирования (409 мкг/мл). Однако изолят № 1 также показал существенные редуцирующие свойства спустя 72 ч – 407 мкг/мл. Интересна разница показателей при достижении 48 ч культивирования: изолят № 2 – 250 мкг/мл, изолят № 1 – всего 165 мкг/мл. Культивирование более 72 ч является нецелесообразным, т. к. результаты исследования подтверждают наличие железоредуцирующих свойств у исследуемых изолятов.

Филогенетический анализ изолятов, основанный на сравнении нуклеотидных последовательностей 16S РНК, показал, что штаммы близки между собой и относятся к известным видам (рис. 4 и 5).

Данные филогенетического анализа 16S РНК позволяют отнести изолят № 1 к роду *Shewanella*, а изолят № 2 к роду *Geobacter*. Оба этих таксона включают в себя обширные группы сульфид- и железоредуцирующих бактерий, способных накапливать электрический заряд на своей поверхности [32, 37].

Таким образом, из источника Абаканский Аржан удалось выделить 2 вида железоредуцирующих бактерий: *Shewanella algae* и *Geobacter sulfurreducens*.

Выводы

Проблема выработки чистой энергии на сегодняшний день стоит крайне остро. Верным с точки зрения экологии и защиты окружающей среды является применение технологий микробного синтеза электроэнергии. Этот способ производства электричества основывается на способности штаммов микроорганизмов генерировать протоны водорода в среде, содержащей необходимый субстрат. При этом эмиссия CO_2 отсутствует. Некоторые микроорганизмы-экстремофилы способны потреблять органические вещества и генерировать энергию. Интерес представляет микробиота горячих источников. По известным данным роды *Shewanella* и *Geobacter* имеют электропроводящие отростки, облегчающие прямой перенос электронов. Они способны превращать органические отходы, в том числе токсичные, в менее опасные вещества и производить в процессе электричество.

Если эта система будет усовершенствована, то микроорганизмы помогут решить две взаимосвязанные глобальные проблемы – загрязнение окружающей среды и получение чистой энергии.

В ходе изучения микробного сообщества термального источника Абакаский Аржан установлено, что доминирующими филотипами являются *Firmicutes*, *Bacteroides* и *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Thermomonas*, *Gammaproteobacteria* и *Proteobacteria*. Удалось установить наличие схожих последовательностей 16S РНК для филотипов *Shewanella* и *Geobacter* в собранных образцах. Это подтверждает теорию о присутствии железоредуцирующих видов в образцах.

Рисунок 4. Филогенетическое древо изолята № 1, построенное с помощью метода максимального правдоподобия (Maximum Likelihood). Масштаб эволюционных расстояний соответствует 2 заменам на 100 аминокислот последовательности

Figure 4. Phylogenetic tree of isolate 1 by the Maximum Likelihood method. Evolutionary scale: two substitutions per 100 amino acids

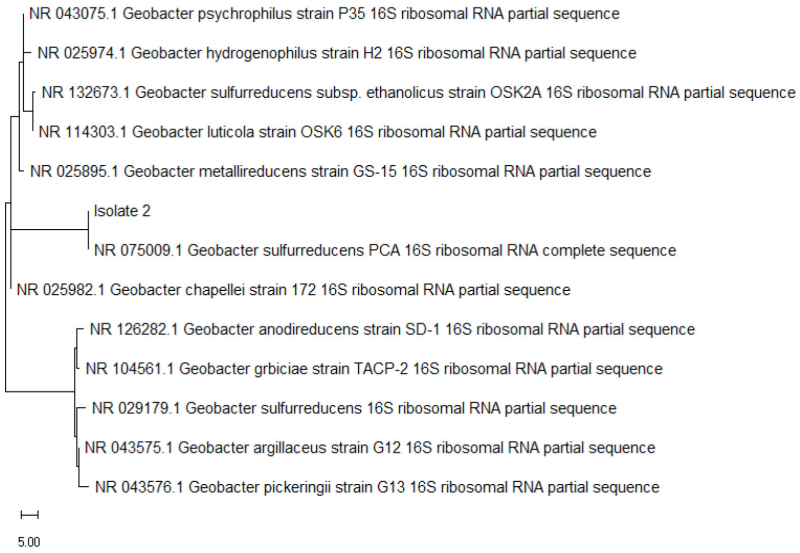


Рисунок 5. Филогенетическое древо изолята № 2, построенное с помощью метода максимального правдоподобия (Maximum Likelihood). Масштаб эволюционных расстояний соответствует 2 заменам на 100 аминокислот последовательности

Figure 5. Phylogenetic tree of isolate 2 by the Maximum Likelihood method. Evolutionary scale: two substitutions per 100 amino acids

Эксперименты по изоляции отдельных видов микробного сообщества позволили получить 9 накопительных культур, 2 из которых показали рост на среде, содержащей ацетат железа (III) и нитрат железа (III). Это свидетельствует о процессе Fe(III)-восстановления. Интенсивнее восстановление железа проходило в образце с изолятом № 2 (*Geobacter sulfurreducens*) после 72 ч культивирования (409 мкг/мл). Однако изолят № 1 (*Shewanella algae*) также показал существенные редуцирующие

свойства 407 мкг/мл. Исходя из представленных данных, актуальным представляется использование и дальнейшее изучение двух видов изолятов, определенных в результате филогенетического и биоинформатического анализов как *S. algae* и *G. sulfurreducens*.

Представленные результаты исследования легли в основу дальнейших экспериментов, направленных на изучение процесса микробного электросинтеза с помощью выделенных изолятов экстремофильных бактерий, а также на конструирование пробного образца микробных топливных элементов и интенсификацию процесса микробного электросинтеза.

Ближайшие аналоги данной технологии предлагают использовать экстремофильные штаммы, не способные активно потреблять органические субстраты. Следовательно, основными отличиями технологии являются не только возможность получения электроэнергии с помощью микробного синтеза, но и переработка сложных органических отходов (включая нативные субстраты сельского хозяйства: коллаген, кератин, эластин). Таким образом, конечной целью применения технологии микробного синтеза авторы ставят утилизацию и очистку сточных вод пищевых и перерабатывающих предприятий [38].

Критерии авторства

А. И. Дмитриева руководила научной работой и обеспечивала выполнение экспериментальной части в области молекулярно-биологических исследований. М. Ю. Дроздова и Е. Р. Фасхутдинова обеспечивали выполнение лабораторной части экспериментов по исследованию морфологических и физиологических признаков, а также выделению накопительных культур экстремофльных изолятов. С. С. Кутузов и Л. А. Проскурякова обеспечивали подготовку аналитической части исследования.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

A.I. Dmitrieva supervised the research and performed the experimental part in the field of molecular biological research. M.Yu. Drozdova and E.R. Faskhutdinova were responsible for the laboratory study of morphological and physiological characteristics, as well as the isolation of enrichment cultures of extreme isolates. S.S. Kutuzov and L.A. Proskuryakova provided the analytical part of the study.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. Baryshnikov GYa, Eliseev VA. Siliceous structure of thermal medical waters in Altai-Sayan highland. Izvestiya of Altai State University. 2009;63(3):41–47. (In Russ.). [Барышников Г. Я., Елисеев В. А. Термальные лечебные воды кремнистого состава Алтае-Саянской горной страны // Известия Алтайского государственного университета. 2009. Т. 63. № 3. С. 41–47.].

2. Alekin OA. The Abakan Arzhan thermal spring. Proceedings of the State Hydrological Institute. 1932;(47):41–53. (In Russ.). [Алекин О. А. Термальный источник Абаканский Аржан // Известия государственного гидрологического института. 1932. № 47. С. 41–53.].

3. Oliger TA. The Abakan Arzhan thermal spring. Barnaul; 1981. 204 p. (In Russ.). [Олигер Т. А. Минеральный источник Абаканский. Барнаул, 1981. 204 с.].

4. Bonch-Osmolovskaya EA, Gorlenko VM, Karpov GA, Starynin DA. Anaerobic destruction of organic matter of microbial mats from the Thermophilic spring (Uzon caldera, Kamchatka). Microbiology. 1987;(56):1022–1028. (In Russ.). [Анаэробная деструкция органического вещества микробных матов источника Термофильного (кальдера Узон, Камчатка) / Е. А. Бонч-Осмоловская [и др.] // Микробиология. 1987. № 56. С. 1022–1028.].

5. Jiang Y, Song R, Cao L, Su Z, Ma Y, Liu Y. Harvesting energy from cellulose through Geobacter sulfurreducens in Unique ternary culture. Analytica Chimica Acta. 2019;1050:44–50. https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.059

6. Gul H, Raza W, Lee J, Azam M, Ashraf M, Kim K-H. Progress in microbial fuel cell technology for wastewater treatment and energy harvesting. Chemosphere. 2021;281. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130828

7. Wang H, Qi X, Chen S, Wang X. The efficient treatment of breeding wastewater by an electroactive microbial community in microbial fuel cell. Journal of Environmental Chemical Engineering. 2022;10(2). https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107187

8. Liang P, Duan R, Jiang Y, Zhang X, Qiu Y, Huang X. One-year operation of 1000-L modularized microbial fuel cell for municipal wastewater treatment. Water Research. 2018;141:1–8. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.066

9. Singh V. Microbial cell factories engineering for production of biomolecules. Academic Press; 2021. 462 p. https://doi.org/10.1016/C2019-0-03952-0

10. Sánchez C, Dessì P, Duffy M, Lens PNL. Microbial electrochemical technologies: Electronic circuitry and characterization tools. Biosensors and Bioelectronics. 2020;150. https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111884

11. Greenman J, Gajda I, You J, Mendis BA, Obata O, Pasternak G, *et al.* Microbial fuel cells and their electrified biofilms. Biofilm. 2021;3. https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2021.100057

12. Ishii S, Shimoyama T, Hotta Y, Watanabe K. Characterization of a filamentous biofilm community established in a cellulose-fed microbial fuel cell. BMC Microbiology. 2008;8. https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-6

13. Rismani-Yazdi H, Christy AD, Dehority BA, Morrison M, Yu Z, Tuovinen OH. Electricity generation from cellulose by rumen microorganisms in microbial fuel cells. Biotechnology and Bioengineering. 2007;97(6):1398–1407. https://doi.org/10.1002/bit.21366

14. Ye Y, Liu X, Nealson KH, Rensing C, Qin S, Zhou S. Dissecting the structural and conductive functions of nanowires in *Geobacter sulfurreducens* electroactive biofilms. mBio. 2022;13(1). https://doi.org/10.1128/mbio.03822-21

15. Hu Y, Wang Y, Han X, Shan Y, Li F, Shi L. Biofilm biology and engineering of *Geobacter* and *Shewanella* spp. for energy applications. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2021;9. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.786416

16. Lovley DR, Walker DJF. *Geobacter* protein nanowires. Frontiers in Microbiology. 2019;10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02078

17. Toporek YJ, Mok JK, Shin HD, Lee BD, Lee MH, DiChristina TJ. Metal reduction and protein secretion genes required for iodate reduction by *Shewanella oneidensis*. Applied and Environmental Microbiology. 2019;85(3). https://doi.org/10.1128/AEM.02115-18

18. Jing X, Wu Y, Shi L, Peacock CL, Ashry NM, Gao C, *et al.* Outer membrane *c*-type cytochromes OmcA and MtrC play distinct roles in enhancing the attachment of *Shewanella oneidensis* MR-1 cells to goethite. Applied and Environmental Microbiology. 2020;86(23):1–17. https://doi.org/10.1128/AEM.01941-20

19. Zarei M, Mir-Derikvand M, Hosseinpour H, Samani TR, Ghasemi R, Fatemi F. U (VI) tolerance affects *Shewanella* sp. RCRI7 biological responses: growth, morphology and bioreduction ability. Archives of Microbiology. 2021;204(1). https://doi.org/10.1007/s00203-021-02716-6

20. Thulasinathan B, Nainamohamed S, Ebenezer Samuel JO, Soorangkattan S, Muthuramalingam JB, Kulanthaisamy M, *et al.* Comparative study on *Cronobacter sakazakii* and *Pseudomonas otitidis* isolated from septic tank wastewater in microbial fuel cell for bioelectricity generation. Fuel. 2019;248:47–55. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.03.060

21. Pankan AO, Yunus K, Fisher AC. Mechanistic evaluation of the exoelectrogenic activity of *Rhodopseudomonas palustris* under different nitrogen regimes. Bioresource Technology. 2020;300. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122637

22. Liu C-H, Lee S-K, Ou I-C, Tsai K-J, Lee Y, Chu Y-H, *et al.* Essential factors that affect bioelectricity generation by *Rhodopseudomonas palustris* strain PS3 in paddy soil microbial fuel cells. International Journal of Energy Research. 2021;45(2):2231–2244. https://doi.org/10.1002/er.5916

23. Angelia C, Sanjaya A, Aida, Tanudjaja E, Victor H, Cahyani AD, *et al.* Characterization of alpha-amylase from aspergillus niger aggregate F isolated from a fermented cassava gatot grown in potato peel waste medium. Microbiology and Biotechnology Letters. 2019;47(3):364–371. https://doi.org/10.4014/mbl.1811.11011

24. Yang Y, Xu P, Dong S, Yu Y, Chen H, Xiao J. Using watermelon rind and nitrite-containing wastewater for electricity production in a membraneless biocathode microbial fuel cell. Journal of Cleaner Production. 2021;307. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127306

25. Otero FJ, Chan CH, Bond DR. Identification of different putative outer membrane electron conduits necessary for Fe(III) Citrate, Fe(III) Oxide, Mn(IV) oxide, or electrode reduction by *Geobacter sulfurreducens*. Journal of Bacteriology. 2018;200(19). https://doi.org/10.1128/JB.00347-18

26. Boedicker JQ, Gangan M, Naughton K, Zhao F, Gralnick JA, El-Naggar MY. Engineering biological electron transfer and redox pathways for nanoparticle synthesis. Bioelectricity. 2021;3(2):126–135. https://doi.org/10.1089/bioe.2021.0010

27. Liu X, Holmes DE, Walker DJF, Li Y, Meier D, Pinches S, *et al.* Cytochrome OmcS is not essential for extracellular electron transport via conductive pili in *Geobacter sulfurreducens* strain KN400. Applied and Environmental Microbiology. 2022;88(1). https://doi.org/10.1128/AEM.01622-21

28. Fernandes TM, Morgado L, Turner DL, Salgueiro CA. Protein engineering of electron transfer components from electroactive *Geobacter* bacteria. Antioxidants. 2021;10(6). https://doi.org/10.3390/antiox10060844

29. Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM. Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume One: The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria. New York: Springe; 2001. 722 p. https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6

30. Andreeva A, Budenkova E, Babich O, Sukhikh S, Ulrikh E, Ivanova S, *et al.* Production, purification, and study of the amino acid composition of microalgae proteins. Molecules. 2021;26(9). https://doi.org/10.3390/molecules26092767

31. Gadol HJ, Elsherbini J, Kocar BD. Methanogen productivity and microbial community composition varies with iron oxide mineralogy. Frontiers in Microbiology. 2022;12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705501

32. Zhan Y, Yang M, Zhang Y, Yang J, Wang W, Yan L, *et al.* Iron and total organic carbon shape the spatial distribution pattern of sediment Fe(III) reducing bacteria in a volcanic lake, NE China. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2021;37(9). https://doi.org/10.1007/s11274-021-03125-z

33. Merino C, Kuzyakov Y, Godoy K, Jofré I, Nájera F, Matus F. Iron-reducing bacteria decompose lignin by electron transfer from soil organic matter. Science of the Total Environment. 2020;761. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143194

34. Muyizer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology. 1993;59(3):695–700. https://doi.org/10.1128/aem.59.3.695-700.1993

35. Prosekov AYu, Babich OO, Bespomestnykh KV. Identification of industrially important lactic acid bacteria in foodstuffs. Foods and Raw Materials. 2013;1(2):42–45. https://doi.org/10.12737/2053

36. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Research. 2013;41:D590–D596. https://doi.org/10.1093/nar/gks1219

37. Schmidt TM, Arieli B, Cohen Y, Padan E, Strohl WR. Sulfur metabolism in Beggiatoa alba. Journal of bacteriology. 1987;169(12):5466–5472. https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5466-5472.1987

38. Prosekov AYu, Timoshchuk IV, Gorelkina AK. On the issue of the use of waste from water desalting ion exchange units of power plants. Theoretical and Applied Ecology. 2021;(4):127–132. (In Russ.). https://doi.org/10.25750/1995-4301-2021-4-127-132