

**Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»**

На правах рукописи

ЗАВАРЗИНА Дарья Георгиевна

**ТРАНСФОРМАЦИЯ МИНЕРАЛОВ ЖЕЛЕЗА
АНАЭРОБНЫМИ БАКТЕРИЯМИ СОДОВЫХ ОЗЕР**

Специальность 1.5.11 – микробиология

**ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени доктора биологических наук**

МОСКВА – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность темы исследования	6
Состояние вопроса	8
Цель и задачи исследования	11
Научная новизна	11
Теоретическая и практическая значимость работы	13
Положения, выносимые на защиту	14
Структура диссертации	15
Публикации	15
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	21
1.1. Биогеохимический цикл железа	21
1.1.1. Геохимия железа	21
1.1.2. Гидрохимия железа	22
1.1.3. Минералы железа, вовлеченные в микробную трансформацию	25
1.1.4. Месторождения железа и их связь с жизнедеятельностью микроорганизмов	32
1.1.4.1. Озерно-болотные руды	32
1.1.4.2. Железомарганцевые конкреции	35
1.1.4.3. Железисто-кремнистые формации докембрия	37
1.2. Прокариоты, восстанавливающие и окисляющие минералы железа в восстановительных условиях при нейтральных или щелочных значениях рН	40
1.2.1. Анаэробное фотозависимое окисление железа	40
1.2.2. Анаэробное нитрат-зависимое окисление железа	44
1.2.3. Анаэробное восстановление железа	47
1.2.3.1. Таксономия и экология диссимиляционных железоредукторов	47
1.2.3.2. Минералы, используемые железоредукторами	51
1.2.3.3. Восстановленные минеральные фазы, образующиеся в процессе железоредукции	53
1.2.3.4. Стратегии микробного взаимодействия с нерастворимыми соединениями Fe(III)	54
1.3. Содовые озера как естественные местообитания алкалофильных бактерий	58
1.3.1. Образование содовых озер	58
1.3.2. Анаэробные микробные сообщества содовых озер	62
1.3.2.1. Продуценты алкалофильных микробных сообществ	64
1.3.2.2. Анаэробное разложение органического вещества	64
1.3.2.3. Восстановление железа алкалофильными бактериями	70
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	72
2.1. Природные образцы	72

2.2. Состав сред и условия культивирования.....	73
2.3. Определение морфологических, физиологических и метаболических свойств.....	75
2.3.1. Микроскопия	75
2.3.2. Диапазоны температуры, рН и концентрации NaCl.....	75
2.3.3. Использование доноров и акцепторов электронов	75
2.3.4. Чувствительность к антибиотикам	76
2.4. Аналитические методы	76
2.4.1. Колориметрические методы.....	76
2.4.2. Хемотаксономический анализ	77
2.4.3. Молекулярные методы	77
2.4.3.1 Выделение ДНК.....	77
2.4.3.2. Количественная ПЦР (кПЦР).....	79
2.4.3.3. Секвенирование библиотек ампликонов.....	79
2.4.3.4. Филогенетический анализ	79
2.4.3.5. Анализ геномов.....	80
2.4.3.6. Оценка распространения новых микроорганизмов	80
2.5. Методы исследования минералов	80
2.5.1. Метод Мёссбауэровской спектроскопии	81
2.5.2. Метод порошковой рентгеновской дифракции.....	82
2.5.3. Рамановская спектроскопия	82
2.5.4. Спектроскопия электронного магнитного резонанса	83
2.5.5. Метод сканирующей электронной микроскопии.....	83
2.5.6. Метод пиролиза Rock-Eval33	83
2.6. Термодинамические расчеты.....	84
ГЛАВА 3. АЛКАЛОФИЛЬНЫЕ ЖЕЛЕЗОРЕДУЦИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ.....	85
3.1. Оценка распространенности процесса диссимиляционной железоредукции в содовых озерах.	85
3.2. Новые литоавтотрофные алкалофильные железоредукторы	86
3.2.1. <i>Geoalkalibacter ferrihydriticus</i> Z-0531 ^T gen. nov., sp. nov.	86
3.2.2. <i>Dethiobacter alkaliphilus</i>	89
3.2.2.1. Штамм Z-1002.....	89
3.2.2.2. Исследование способности к литотрофной железоредукции у типового штамма <i>Dethiobacter alkaliphilus</i> АНТ1 ^T	91
3.2.2.3. Поиск и анализ генов, ответственных за восстановление серы и железа у штаммов АНТ1 ^T и Z-1002.....	92
3.2.2.4. Анализ распространения представителей рода <i>Dethiobacter</i> и семейства <i>Dethiobacteraceae</i> в природе.....	93

3.2.3. <i>Fuchsiella alkaliacetigena</i> gen. nov. Z-7100 ^T , sp. nov., <i>Fuchsiella ferrireducens</i> sp. nov. Z-7102 ^T	96
3.3. Новые органогетеротрофные алкалофильные железоредукторы	102
3.3.1. <i>Natronincola ferrireducens</i> sp. nov. Z-0511 ^T , <i>Natronincola peptidovorans</i> sp. nov., Z-7031 ^T	102
3.3.2. <i>Alkaliphilus peptidifermentans</i> sp. nov. Z-7036 ^T	105
3.3.3. <i>Isachenkonina alkalipeptolytica</i> gen. nov., sp. nov. Z-1701 ^T	109
3.4. Прямое восстановление Fe(III) из синтезированного ферригидрита галоалкалофильными литотрофными сульфидогенами	113
3.4.1. Восстановление галоалкалофильными сульфидогенами синтезированного ферригидрита при росте на формиате	114
3.4.2. Восстановление галоалкалофильными сульфидогенами синтезированного ферригидрита при росте на водороде	116
3.4.3. Геномный анализ	116
ГЛАВА 4. ОСОБЕННОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ СИНТЕЗИРОВАННОГО ФЕРРИГИДРИТА <i>GEOALKALIBACTER FERRIHYDRITICUS</i> В ЧИСТОЙ И БИНАРНЫХ КУЛЬТУРАХ	118
4.1. Исследование процессов образования минералов железа при восстановлении синтезированного ферригидрита <i>Geoalkalibacter ferrihydriticus</i>	118
4.2. Восстановление синтезированного ферригидрита бинарной анаэробной культурой <i>Anaerobacillus alkalilacustris</i> и <i>Geoalkalibacter ferrihydriticus</i> при pH 9.5	121
4.2.1. Восстановление синтезированного ферригидрита бинарной культурой <i>A. alkalilacustris</i> и <i>G. ferrihydriticus</i> использующей маннит	123
4.2.2. Восстановление синтезированного ферригидрита <i>G. ferrihydriticus</i> с комбинацией доноров	127
4.2.3. Восстановление синтезированного ферригидрита <i>G. ferrihydriticus</i> с отдельными донорами	129
4.3. Восстановление синтезированного ферригидрита бинарной анаэробной культурой <i>Clostridium alkalicellulosi</i> и <i>Geoalkalibacter ferrihydriticus</i> при разложении микрокристаллической целлюлозы	129
4.4. Восстановление синтезированного ферригидрита синтрофной культурой <i>Candidatus "Contubernalis alkalaceticum"</i> и <i>G. ferrihydriticus</i> на этаноле	132
4.4.1. Получение устойчивой синтрофной ассоциации <i>Ca. "Contubernalis alkalaceticum"</i> и <i>G. ferrihydriticus</i>	133
4.4.2. Кинетика роста синтрофной ассоциации <i>Ca. "Contubernalis alkalaceticum"</i> и <i>G. ferrihydriticus</i> на синтезированном ферригидрите и этаноле	135
4.5. Кинетика роста синтрофной культуры <i>Ca. "Contubernalis alkalaceticum"</i> и <i>G. ferrihydriticus</i> на этаноле	140
4.5.1. Энергетический метаболизм " <i>Ca. C. alkalaceticum</i> "	142
4.5.2. Геномный анализ способности <i>Ca. "C. alkalaceticum"</i> к внеклеточному переносу электронов	143
4.5.3. Геномный анализ способности <i>G. ferrihydriticus</i> к литотрофному гомоацетогенезу	144

ГЛАВА 5. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СМЕШАННОВАЛЕНТНЫХ МИНЕРАЛОВ ЖЕЛЕЗА АЛКАЛОФИЛЬНЫМИ АНАЭРОБАМИ В КАТАБОЛИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ В ЧИСТЫХ И БИНАРНЫХ КУЛЬТУРАХ.....	145
5.1. Трансформация биотита и глауконита анаэробными алкалофилами.....	145
5.1.1. Трансформация биотита и глауконита <i>G. ferrihydriticus</i> в присутствии ацетата...	146
5.1.2. Трансформация биотита и глауконита в бинарной культуре <i>C. alkalicellulosi</i> и <i>G. ferrihydriticus</i> при разложении микрокристаллической целлюлозы	152
5.2. Трансформация магнетита алкалофильными анаэробами.....	156
5.2.1. Трансформация магнетита <i>G. ferrihydriticus</i> в присутствии этанола.....	156
5.2.2. Трансформация магнетита синтрофной культурой <i>Ca. "Contubernalis alkalaceticum"</i> и <i>G. ferrihydriticus</i> на этаноле.....	157
ГЛАВА 6. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИДЕРИТА И МЕТАЛЛИЧЕСКОГО ЖЕЛЕЗА АЛКАЛОФИЛЬНЫМИ АНАЭРОБАМИ В КАТАБОЛИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ В ЧИСТЫХ И БИНАРНЫХ КУЛЬТУРАХ.....	163
6.1. Анаэробное окисление сидерита <i>Fuchsiella ferrireducens</i>	163
6.2. Анаэробное окисление сидерита <i>Dethiobacter alkaliphilus</i> , штамм Z-1002	164
6.3. Анаэробное окисление сидерита синтрофной культурой <i>Ca. "Contubernalis alkalaceticum"</i> и <i>G. ferrihydriticus</i> на этаноле	167
6.4. Анаэробная коррозия металлического железа под воздействием <i>G. ferrihydriticus</i>	171
6.4.1. Характеристика и подготовка используемой стальной проволоки.....	173
6.4.2. Условия эксперимента	174
6.4.3. Рост <i>G. ferrihydriticus</i> в присутствии металлического железа.....	174
ГЛАВА 7. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗВИТИЯ АНАЭРОБНЫХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ЗА СЧЕТ ТРАНСФОРМАЦИИ МИНЕРАЛОВ ЖЕЛЕЗА В АВТОТРОФНЫХ УСЛОВИЯХ	181
7.1. Фототрофное сообщество, алкалофильных анаэробных бактерий из осадков озера Хадын.....	181
7.1.1. Получение устойчивой накопительной культур	181
7.1.2. Выделение микроорганизмов, входящих в состав накопительной культуры анаэробного фототрофного железоокисляющего сообщества	184
7.2. Микробное сообщество термофильных анаэробных бактерий, осуществляющих циклическую трансформацию сидерита.....	188
7.2.1. Получение устойчивой накопительной термофильной культуры, осуществляющей анаэробное окисление сидерита в автотрофных условиях	189
7.2.2. Масштабирование эксперимента в анаэробном ферментере.....	193
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	203
ВЫВОДЫ	208
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:	210

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Криптозой, составляющий $\frac{3}{4}$ геологической истории Земли, является важнейшим этапом становления биосферы. В этот период за счет жизнедеятельности преимущественно прокариот атмосфера, гидросфера, и верхняя часть литосферы Земли претерпели значительные изменения, в результате которых были созданы условия, способствующие развитию эволюционно более сложных форм жизни. Биосфера тесно связана с верхней частью геосферы, взаимодействие с которой осуществляется за счет биогеохимических циклов, обеспечивающих устойчивое развитие биосферы и поддержание жизни на Земле (Заварзин, 2011). Центральным биогеохимическим циклом является цикл углерода, который сопряжен с циклами биосферно значимых элементов - кислорода, азота, серы, железа, фосфора, кальция и кремния. Катализаторами химических реакций и циклических превращений являются микроорганизмы (Заварзин, 2011). На протяжении более 2 млрд лет – в архее-протерозое - на Земле происходил масштабный процесс образования осадочных железисто-кремнистых формаций, составляющих около 60% мировых запасов железных руд (Bekker et al., 2010). Ограниченный парагенезис минералов этих пород, представлен кварцем и минералами двух- и трехвалентного железа – оксидами, карбонатами и силикатами с минимальным содержанием сульфидов. Если учесть стремление химических элементов к рассеянию (Страхов, 1963), следует признать, что процессы, связанные с окислительно-восстановительными реакциями с участием железа, происходили в этот период истории Земли повсеместно и при благоприятном сочетании геологических и геоморфологических условий это приводило к формированию месторождений железистых кварцитов. Таким образом, процессы, связанные с трансформацией железа долгое время играли ведущую роль и в зоне гипергенеза, и в океане, что не могло не отразиться на функционировании микробных сообществ докембрия. Парадоксально высокая средняя степень окисления железа (+2.4) в минералах железисто-кремнистых формаций, заставляет искать эффективный способ окисления двухвалентного железа, признанного учеными первичной формой для этих пород в условиях бескислородной атмосферы (Klein, 2005).

Катаболические реакции с участием железа дают высокий выход энергии (Lovely, 2004), что определяет широкую распространенность хемотрофных микроорганизмов, развивающихся за счет окисления двух- или восстановления трехвалентного железа. Ацидофильные железобактерии играют ведущую роль в разрушении сульфидных руд (Johnson and Hallberg, 2009), в то время как нейтрофильные ответственны за образование ферригидрита – минерала-предшественника оксидов и гидроксидов железа, составляющих

основу болотных железных руд, и наиболее выгодного акцептора для диссимиляционных железоредукторов (Fleming et al., 2011). В свою очередь, диссимиляционные железоредукторы – прокариоты, получающие энергию за счет восстановления трехвалентного железа, выявлены практически во всех экологических нишах и ответственны за образование восстановленных минералов железа – магнетита, сидерита и вивианита (Lovely et al., 2004). Открытые в конце прошлого века процессы анаэробного фото- и нитрат-зависимого окисления железа (Widdel et al., 1993; Straub et al., 1996), осуществляемые прокариотами, способными эффективно окислять двухвалентное железо в анаэробных условиях, позволили геологам рассматривать биогенный фактор как ведущий в образовании породообразующих минералов железисто-кремнистых формаций (Konhauser et al., 2005; Kappler et al., 2005). Источником железа и кремнезема в железистых кварцитах ученые считают либо выветриваемые породы древней суши, либо гидротермальные процессы при подводной вулканической деятельности (Posth et al., 2011). Однако следует отметить, что огромные количества железа, сконцентрированные в этих формациях, могут быть объяснены только совместным вкладом этих двух источников (Holland, 1973). Таким образом, при рассмотрении процессов микробной трансформации железа в период образования железистых кварцитов следует учитывать не только процессы, происходившие на шельфе или в глубоких частях океана, но и на поверхности континентов.

Углекислотное выветривание, основанное на универсальных физико-химических процессах взаимодействия воды с горными породами в субаэральных условиях, является ведущим фактором преобразования магматических горных пород в осадочные на поверхности Земли. Конечным результатом углекислотного выветривания в бессточных областях, суммирующим в локальной естественной модели этот процесс является образование содовых озер (Заварзин, 2007). Масштабы глобального процесса образования сильнощелочных вод в архее, как результат интенсивного выветривания обогащенных железом пород основного состава при взаимодействии с водой в атмосфере, содержащей более высокие концентрации CO_2 , по сравнению с современными (Catling and Zahnle, 2020) оценил С. Кемпе, предложивший модель «содового океана» (Kempe and Degens, 1985). Эта модель не получила поддержки, прежде всего, из-за невозможности объяснить в ее рамках общепринятое предположение о существовании в это время Fe^{2+} в океане в растворенном состоянии. Гипотеза «содового континента», выдвинутая Г.А. Заварзиным (1993), как развитие гипотезы С. Кемпе, предполагала существование в архее-протерозое на континентах обширных содовых водоемов, которые могли служить центрами распространения наземной микробиоты. В этом случае, в условиях доминирования биогеохимического цикла железа, большую роль в трансформации минералов железа и деградации органического вещества должны были играть

алкалофильные микроорганизмы, получающие энергию за счет окисления/восстановления железа.

Интенсивные исследования анаэробных микробных сообществ современных содовых озер выявили их функциональное и фенотипическое разнообразие, автономность и почти полную замкнутость основных биогеохимических циклов с возможностью осуществлять все этапы разложения органического вещества (Заразнин и др., 1996; Sorokin et al., 2015; Grant and Jones, 2016). Однако в условиях современной атмосферы, содержащей кислород, в илах содовых озер доминирует цикл серы, включающий сульфаты, а также выгодную для восстановления растворимую полисульфидную форму, образующуюся в щелочных условиях за счет реакции серы с сульфидом (Sorokin et al., 2011). В результате сульфидогены играют ведущую роль на заключительных этапах разложения органического вещества (Sorokin et al., 2011, 2014a), а возможность развития алкалофильных микроорганизмов, осуществляющих окисление/восстановление железа, фактически оставалась вне рамок систематических исследований.

Таким образом, в контексте фундаментальных вопросов, связанных с протяженным этапом развития геосферы и биосферы Земли, во время которого доминировал биогеохимический цикл железа и осуществлялось массовое отложение осадочных железных руд, восполнение существующих пробелов знаний относительно микробной трансформации минералов железа в анаэробных щелочных условиях представляется важным и актуальным.

Состояние вопроса

Микроорганизмы, окисляющие железо в процессе хемосинтеза, являлись одними из первых объектов исследования микробиологов. Еще в 1836 году Х. Г. Эренбергом было сделано предположение, что донные отложения бурого железняка в болотах и водоемах являются результатом жизнедеятельности железобактерий. Классические Fe- и Mn-окисляющие бактерии, принадлежащие к родам *Gallionella*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix* и *Clonothrix*, были описаны в девятнадцатом веке- (Emerson et al., 2010). При исследовании *Leptothrix ochracea*, С. Н. Виноградский указал на то, что эта бактерия, вероятно, может автотрофно окислять двухвалентное железо в процессе хемосинтеза (Winogradsky, 1988). Дальнейшие исследования показали, что среди железобактерий есть как гетеротрофные виды, пассивно отлагающие окислы железа на чехлах, так и хемолитотрофные бактерии, для которых окисление железа является энергетическим процессом (Emerson, 2010). Процесс диссимиляционного восстановления железа был открыт значительно позже – в конце 20-го века. В 1980 году было продемонстрировано восстановление ферригидрита факультативно-анаэробной бактерией рода *Pseudomonas*, при использовании молекулярного водорода в

качестве донора электронов (Балашова и Заварзин 1980). Позднее, в 1988 году в накопительных культурах была показана способность микроорганизмов восстанавливать железо хемоорганотрофно, окисляя при этом некоторые органические кислоты и спирты (Lovley and Phillips, 1988). *Shewanella oneidensis* (Myers and Nealson, 1988) и *Geobacter metallireducens* (Lovley et al., 1993) - первые диссимиляционные марганец- и железоредуцирующие бактерии, выделенные в чистую культуру, способные к катаболическому восстановлению оксидов и гидроксидов железа, стали модельными микроорганизмами для изучения биохимических механизмов железоредукции и ознаменовали этап интенсивного исследования этого процесса. За истекшие десятилетия накоплен большой объем информации, относительно таксономического разнообразия, распространения, функциональных возможностей диссимиляционных железоредукторов, а также биохимических особенностей, позволяющих этим организмам использовать минералы железа в качестве акцептора электронов (Nixon et al., 2022; Lovley, 2013). Описано более 150 новых таксонов железоредукторов, большинство которых развиваются в нормальных условиях — это мезофилы и нейтрофилы, имеющие оптимум роста при температурах 25-35 °С и значениях рН 6.5-7.5. Однако примерно 40% известных видов выделены из экстремальных мест обитания (Nixon et al., 2022). Наиболее изученной среди экстремофильных железоредукторов является группа термофильных микроорганизмов, весомый вклад в изучение которых внесли отечественные микробиологи – А.И. Слободкин, Г.Б. Слободкина, С.Н. Гаврилов. Остальные группы экстремофильных железоредукторов – психрофилы, ацидофилы и алкалофилы исследованы значительно хуже.

Процесс анаэробного окисления железа был продемонстрирован группой Ф. Видделя в 1993 году, сначала для аноксигенных фототрофов, а затем для нитратредукторов (Widdel et al., 1993; Straub et al., 1996). Использование в катаболических реакциях световой энергии (фото-) и Fe(II) (-ферро) было впервые описано у пурпурных бактерий, растущих как автотрофно, так и гетеротрофно (Widdel et al., 1993; Ehrenreich and Widdel, 1994). Позднее способность к анаэробному окислению железа была обнаружена также у пурпурных несерных бактерий и зеленых серных бактерий (Camacho et al., 2017). Аноксигенный фотосинтез с Fe(II) в качестве донора электронов, использующий исключительно фотосистему I, был предложен как самый ранний тип фотосинтетического процесса (Raymond et al., 2003), что подтверждается данными молекулярно-филогенетического анализа ферментов, участвующих в биосинтезе бактериохлорофилла и указывающих на существование аноксигенных фототрофов до появления оксигенных фототрофов (Xiong, 2006; Gupta, 2013). В процессе исследований оказалось, что и фотоферротрофы, и нитратредукторы способны использовать закисное

железо как в растворенном виде, так и входящим в состав карбонатов (сидерит), оксидов (магнетит) и сульфидов (пирротин).

Таким образом, на сегодняшний день микробиологи имеют доказательство возможности циклических преобразований минералов железа в анаэробных условиях, при нейтральных значениях pH, за которые ответственны группы диссимиляционных железоредукторов, аноксигенных фототрофов и нитратредукторов. Обращает на себя внимание тот факт, что физико-химические параметры образования железисто-кремнистых формаций докембрия, рассматриваемые большинством ученых, как наиболее вероятные (pH 6.5-8.5; $E_h \leq -100-200$ мВ; T +20-50 °C) (Catling and Zahnle, 2020), соответствуют метастабильному состоянию многих оксидов, гидроксидов, карбонатов и силикатов железа (Гаррелс и Крайст, 1968), и, значит, являются наиболее благоприятными для микроорганизмов, использующих железо в качестве донора или акцептора электрона в процессах хемосинтеза в восстановительных условиях (Заварзин, 1972). Высокая интенсивность процессов углекислотного выветривания в докембрии, обусловленная большим парциальным давлением углекислоты (Catling and Zahnle, 2020), отсутствием наземной растительности и рядом других факторов, способствовала образованию эпиконтинентальных содовых водоемов, в которых был редуцирован биогеохимический цикл серы из-за отсутствия сульфатов. При реконструкции условий, существующих на континентах в докембрии, следует также учитывать, что выветриваемые породы того времени – коматииты и вулканиты архейских зеленокаменных поясов содержали огромное количество железа. Даже докембрийские гранитоиды по расчетам содержали на порядок выше магнетита, чем его среднее содержание в гранитоидах фанерозоя (Holland, 1973; Холодов и Бутузова, 2004). Таким образом, современные содовые озера могут рассматриваться как актуалистические модели древних экосистем (Заварзин, 1993), но только при условии исключения из процесса анаэробного разложения органического вещества сульфидогенов и поиска алкалофильных диссимиляционных железоредукторов, выполняющих функцию полной минерализации органического вещества, заключающуюся, прежде всего, в окислении ацетата и водорода -- конечных восстановленных продуктов, накапливающихся в процессе микробной деградации органики.

К началу наших исследований сведения о возможности трансформации минералов железа в анаэробных условиях при $pH \geq 9.0$ были крайне ограничены. Среди бактерий, использующих трехвалентное железо в качестве источника энергии в диссимиляционных процессах, был известен только невалидированный вид «*Alkaliphilus metalliredigens*», выделенный из щелочного водоема, образовавшегося на месте добычи бора в США (Ye et al.,

2004), и использующий только растворимые органические комплексы Fe(III) с лактатом и дрожжевым экстрактом в качестве субстратов. Кроме того, способность восстанавливать железо в комплексе NTA-Fe(III) с лактатом была продемонстрирована для клеточной суспензии *Bacillus arsenicoselenatis* (Switzer Blum et al., 1998). Неспецифическое восстановление ферригидрита в магнетит осуществляла галоалкалофильная бактерия *Tindallia magadiensis*, использующая в качестве доноров электронов пептон, цитрат, 2,3-бутандиол или пируват (Kevbrin et al., 1998), а также термоалкалофильная бактерия *Anaerobranca californiensis* при сбраживании пептидов (Gorlenko et al., 2004). Возможность прямого восстановления окисного железа, входящего в состав аморфных и слабокристаллических оксидов железа в щелочной среде ставилась под сомнение из-за его низкой подвижности (Ye et al., 2004). Таким образом, очевидной была необходимость проведения комплексных исследований в направлении изучения трансформации минералов железа под воздействием анаэробных алкалофильных бактерий содовых озер, с целью восполнения существующих пробелов в области знаний о биосферных и геосферных процессах, имевших место в докембрии на протяжении большей части геологической истории Земли.

Цель и задачи исследования

Целью исследования являлось доказательство существования алкалофильных анаэробных бактерий, способных получать энергию за счет диссимиляционной лито- и органотрофной железоредукции минералов, содержащих трехвалентное железо.

Задачи исследования состояли в следующем:

1. Провести направленный поиск в содовых озерах разных климатических зон органотрофных и литоавтотрофных микроорганизмов, способных к диссимиляционному восстановлению минералов железа.
2. Установить таксономическое положение новых изолятов, изучить их фенотипические и генотипические свойства.
3. Исследовать процессы трансформации минералов железа, относящихся к различным классам, в комбинированных и чистых культурах.
4. Исследовать возможность процессов фотозависимого анаэробного окисления минералов железа при $pH \geq 9.0$

Научная новизна

Описаны и узаконены 7 новых таксонов (в том числе 3 новых рода) алкалофильных анаэробных бактерий, использующих соединения железа в качестве акцепторов электронов в энергетическом метаболизме - *Geoalkalibacter ferrihydriticus* gen. nov., sp. nov. *Fuchsiella*

alkaliacetigena gen. nov., sp. nov., *Fuchsiella ferrireducens* sp. nov., или в процессе облегченного брожения - *Natronincola ferrireducens* sp. nov., *Natronincola peptidovorans* sp. nov., *Alkaliphilus peptidifermentans* sp. nov., *Isachenkonina alkalipeptolytica* gen. nov., sp. nov.

Выделены в чистую культуру и охарактеризованы первые облигатно алкалофильные хемолитоавтотрофные бактерии (*Geoalkalibacter* gen. nov., *Fuchsiella* gen. nov., *Dethiobacter alkaliphilus* Z-1002), использующие нерастворимые минералы железа в качестве акцепторов и водород или ацетат в качестве доноров электронов. Термодинамическими расчетами показано, что восстановление ферригидрита ($\text{Fe}_{10}\text{O}_{14}(\text{OH})_2$) в щелочных условиях энергетически более выгодно, чем при нейтральных значениях pH.

Доказана способность к прямому восстановлению нерастворимых соединений железа у алкалофильных литотрофных сульфидогенов, что указывает на существенно более тесную, чем считалось ранее, взаимосвязь биогеохимических циклов серы и железа в анаэробных осадках содовых озёр.

Обнаружен новый путь микробной трансформации неорганических соединений – анаэробное окисление железа, сопровождающееся образованием ацетата. Показана способность анаэробных бактерий, относящихся к родам *Geoalkalibacter* и *Dethiobacter* осуществлять как восстановление, так и окисление железа, входящего в состав карбонатов, оксидов, гидроксидов и силикатов. Показано, что в присутствии карбонатов сидерита (FeCO_3) и фужерита ($\text{Fe}^{2+}_4\text{Fe}^{3+}_2(\text{OH})_{12}\text{CO}_3 \times 3\text{H}_2\text{O}$), предпочтительнее окисляется фужерит – минерал группы зеленой ржавчины. Полученные данные существенно расширяют представление об экологической роли железоредуцирующих бактерий, которые ранее рассматривались как участники только восстановительной части биогеохимического цикла железа.

Продемонстрирована возможность существования синтрофной культуры, развивающейся за счет трансформации минералов железа и окисления этанола, межвидовое взаимодействие в которой обусловлено в основном механизмом прямого переноса электронов через магнетит (Fe_3O_4). Показано, что в присутствии частично или полностью восстановленных минералов железа облигатный синтроф *Candidatus* "Contubernalis alkalaceticum" получает энергетическое преимущество над гидрогенотрофным партнером *Geoalkalibacter ferrihydriticus*, что позволяет по-новому взглянуть на экологическую роль синтрофных взаимодействий в микробных сообществах, с учетом вовлечения их в трансформацию минералов железа.

Продемонстрирована возможность существования алкалофильного микробного сообщества, в основе развития которого лежит процесс аноксигенного фотозависимого

окисления минералов железа, осуществляемый пурпурной бактерии *Ectothiorodospira shaposhnikovii*.

Показано, что процесс анаэробного окисления сидерита в отсутствии света и нитратов, может осуществляться не только алкалофильными, но и термофильными бактериями. Микробное сообщество термофильных бактерий может успешно развиваться в автотрофных условиях за счет преобразования сидерита, осуществляя его циклическую трансформацию, в которой ацетат и магнетит являются промежуточными продуктами-медиаторами.

Впервые продемонстрирована возможность анаэробной микробно-индуцированной коррозии стали в карбонатной среде при $pH \geq 9.0$. Показано, что основным процессом, приводящим к разрушению стали в этих условиях, является диссимиляционное окисление металлического железа в закисное с использованием протонов воды в качестве акцепторов электронов, сопровождающееся выделением водорода, осуществляемого *Geothalobacter ferrireducens*. Полученные данные имеют принципиальное значение для оценки возможности рисков разрушения железобетонных конструкций.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты представленной работы дают новую информацию о биологическом разнообразии алкалофильных анаэробных прокариот – их филогении и таксономии, физиологии и метаболизме. Они восполняют имевшийся пробел в знаниях о возможности замены функциональной группы алкалофильных сульфидогенов диссимиляционными железоредукторами для осуществления окисления водорода и ацетата на заключительных этапах разложения органического вещества в анаэробных условиях.

Обнаружение нового пути анаэробного диссимиляционного окисления минералов железа в отсутствие света и нитратов и выделение бактерий, осуществляющих его, расширяет представления о функционировании биогеохимического циклов железа в анаэробных условиях. Полученные данные о взаимодействии бактерий в комбинированных культурах, основанных на метабиотических и синтрофных взаимодействиях, позволяют по-новому взглянуть на трофические взаимодействия в анаэробных микробных сообществах и связь биогеохимических циклов углерода и железа. Экспериментально продемонстрированные возможности существования автономных алкалофильных и термофильных микробных сообществ, развивающихся в автотрофных условиях с восстановленными минералами железа в качестве источника энергии, важны для понимания процессов, возможно, протекавших на ранних этапах развития биосферы. Доказательство осуществления ими циклической трансформации сидерита дает ключ к пониманию функционирования биогеохимического цикла железа в архее-протерозое. Такой цикл, неограниченный по ключевым соединениям -

CO₂ и Fe²⁺, мог быть центральным звеном древних биогеохимических циклов, подобно современному циклу углерода с основополагающими реакциями фотосинтеза-дыхания.

Практическая значимость работы заключается, прежде всего, в создании коллекции штаммов алкалофильных анаэробных железоредуцирующих и железooksисляющих прокариот. Новые изоляты представлены как органотрофами, так и литоавтотрофами, способными к восстановлению и окислению железа, серы и ее соединений. Полученные штаммы могут служить объектами для исследования путей их энергетического и конструктивного метаболизма с привлечением данных полногеномного секвенирования, транскриптомики и протеомики. Непосредственное биотехнологическое применение может найти *Geoalkalibacter ferrihydriticus*, являющийся электрогеном. Изучение процесса микробно-индуцированной коррозии стали в восстановительных щелочных средах позволит выработать адекватные и эффективные меры борьбы с этим явлением.

Положения, выносимые на защиту

1. Алкалофильные анаэробные микроорганизмы, выделенные из содовых озер с различной минерализацией и pH ≥ 9.0, способны диссимиляционно восстанавливать минералы железа с использованием в качестве доноров электронов водорода и ацетата, а также широкого спектра органических кислот и спиртов.
2. Альтернативой диссимиляционной железоредукции может служить процесс облегченного сбраживания пептидов, осуществляемый филогенетически и фенотипически близкими друг другу алкалофильными анаэробами семейства *Clostridiaceae*.
3. Многие известные виды алкалофильных литотрофных сульфидогенов способны к железоредукции.
4. Синтрофное окисление этанола может осуществляться алкалофильными анаэробами на основе трансформации как окисленных, так и восстановленных минералов железа. В последнем случае энергетическое преимущество получает облигатный синтроф.
5. Диссимиляционные алкалофильные железоредукторы родов *Geoalkalibacter* и *Dethiobacter* способны осуществлять как восстановление, так и окисление железа, входящего в состав карбонатов и силикатов в отсутствии света и нитратов. Наиболее интенсивному окислению подвергаются гидратированные минералы.
6. Микробные сообщества алкалофильных и термофильных прокариот способны развиваться автономно за счет анаэробного окисления магнетита или сидерита.

7. Магнетит является ключевым минералом-медиатором, способствующим процессам внеклеточного переноса электронов в чистых, бинарных и накопительных культурах анаэробных бактерий.

Структура диссертации

Диссертация состоит из введения, основной части, включающей 7 глав, заключения и выводов, изложенных на 250 страницах, включая 19 таблиц и 58 рисунков, и списка литературы из 497 наименований, из них 63 на русском и 432 на английском языке.

Публикации

Материалы диссертации содержатся в 42 печатных работах, включающих 21 экспериментальные статьи и 21 тезиса.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Экспериментальные статьи

1. Zhilina T.N., **Zavarzina D.G.**, Kuever J., Lysenko A.M., Zavarzin G.A. (2005). *Desulfonatronum cooperativum* sp. nov., a novel hydrogenotrophic, alkaliphilic, sulfate-reducing bacterium, from a syntrophic culture growing on acetate // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. Vol. 55. P. 1001-1006.
2. Жилина Т.Н., **Заварзина Д.Г.**, Колганова Т.В., Турова Т.П., Заварзин Г.А. (2005). *Candidatus "Contubernalis alkalaceticum"* – облигатно синтрофная алкалофильная бактерия, анаэробно окисляющая ацетат в бинарной культуре с *Desulfonatronum cooperativum* // Микробиология. Т. 74. С. 800–809.
3. **Заварзина Д.Г.**, Колганова Т.В., Булыгина Е.С., Кострикина Н.А., Турова Т.П., Заварзин Г.А. (2006). *Geoalkalibacter ferrihydriticus* gen.nov., sp. nov., первый алкалофильный представитель семейства *Geobacteraceae*, выделенный из содового озера // Микробиология 2006. Т. 76. С. 775–785.
4. Жилина Т.Н., **Заварзина Д.Г.**, Осипов Г.А., Кострикина Н.А., Турова Т.П. (2009). *Natronincola ferrireducens* sp.nov. и *Natronincola peptidovorans* sp.nov. - новые анаэробные алкалофильные пептолитические и железоредуцирующие бактерии из содовых озер // Микробиология. Т. 78. С. 506–518.
5. Жилина Т.Н., **Заварзина Д.Г.**, Колганова Т.В., Лысенко А.М., Турова Т.П. (2009). *Alkaliphilus peptidof fermentans* sp. nov., новая алкалофильная бактерия из содового озера, сбраживающая пептиды и восстанавливающая Fe(III) // Микробиология. Т. 78. С. 496–505.

6. **Zavarzina D.G.**, Tourova T.P., Kolganova T.V., Boulygina E.S., Zhilina T.N. (2009). 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*. Vol. 78. P. 723-731.
7. Чистякова Н. И., Русаков В.С., Назарова К. А., Шапкин А. А., Жилина Т. Н., **Zavarzina D.G.** (2010). Исследования процессов образования минералов железа диссимиляционной алкалофильной бактерией *Geoalkalibacter ferrihydriticus* методами Мёссбауэровской спектроскопии // *Известия Российской академии наук. Серия физическая*. Т. 74. С. 433–437.
8. Zhilina T.N., **Zavarzina D.G.**, Panteleeva A.N., Osipov G.A., Kostrikina N.A., Tourova T.P., Zavarzin G.A. (2012). *Fuchsiella alkaliacetigena* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, lithoautotrophic homoacetogen from a soda lake // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* Vol. 62. P. 1666-1673.
9. **Zavarzina D.G.**, Кевбрин В.В., Т.Н. Жилина, Чистякова Н.И., Шапкин А.В., Заварзин Г.А. (2011). Восстановление синтезированного ферригидрита бинарной анаэробной культурой *Anaerobacillus alkalilacustris* и *Geoalkalibacter ferrihydriticus* при росте на манните, рН 9.5 // *Микробиология*. Т. 80. С. 731–746.
10. Шапкин А.А., Чистякова Н.И., Русаков В.С., Жилина Т.Н., **Zavarzina D.G.** (2013). Мёссбауэровские исследования процесса бактериального восстановления железа в природных биотите и глауконите // *Известия РАН. Серия физическая*. Т. 77. С. 812–817.
11. Zhilina T.N., **Zavarzina D.G.**, Detkova E.N., Patutina E.O., Kuznetsov V.B. (2015). *Fuchsiella ferrireducens* sp. nov., a novel haloalkaliphilic, lithoautotrophic homoacetogen capable of iron reduction, and emendation of the description of the genus *Fuchsiella* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* Vol. 65. P. 2432-2440.
12. Shapkin A.A., Chistyakova N.I., **Zavarzina D.G.**, Zhilina T.N., Rusakov V.S. (2015). Mössbauer study of microbial synthesis of iron-containing nanoparticles // *Solid State Phenomena*. Vol. 233–234. P. 766–770.
13. **Zavarzina D.G.**, Chistyakova N.I., Shapkin A.V., Savenko A.V., Zhilina T.N., Kevbrin V.V., Alekseeva T.V., Mardanov A.V., Gavrillov S.N., Bychkov A.Yu. (2016). Oxidative biotransformation of biotite and glauconite by alkaliphilic anaerobes: The effect of Fe oxidation on the weathering of phyllosilicates // *Chem. Geol.* Vol. 439. P. 98–109.

14. Чистякова Н.И., Антонова А.В., Грачева М.А., Шапкин А.А., **Заварзина Д.Г.**, Жилина Т.Н., Русаков В.С. (2017). Мёссбауэровские исследования процессов восстановления синтезированного ферригидрита алкалофильной бактерией *Fuchsiella ferrireducens* // Известия РАН. Серия физическая. Т. 81. С. 989–995.
15. Gracheva M.A., Chistyakova N.I., Antonova A.V., Rusakov V.S., Zhilina T.N., **Zavarzina D.G.** (2017). Mössbauer study of iron minerals transformations by *Fuchsiella ferrireducens* // Hyperfine Interact. V. 238, 84. DOI:10.1007/s10751-017-1460-4.
16. **Заварзина Д.Г.**, Гаврилов С.Н., Жилина Т.Н. (2018). Прямое восстановление Fe(III) из синтезированного ферригидрита галоалкалофильными литотрофными сульфидогенами // Микробиология. Т. 87, С.114–124.
17. **Zavarzina D.G.**, Kochetkova T.V., Chistyakova N.I., Gracheva M.A., Antonova A.V., Merkel A.Yu., Perevalova A.A., Chernov M.C., Koksharov Yu.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Gavrilov S. N., Bychkov A. Yu. (2020). Siderite-based anaerobic iron cycle driven by autotrophic thermophilic microbial consortium // Sci. Rep. Vol. 10. 21661. DOI:10.1038/s41598-020-78605-7.
18. **Zavarzina D.G.**, Gavrilov S.N., Chistyakova N.I., Antonova A.V., Gracheva M.A., - Merkel A.Y., Perevalova A.A., Chernov M.S., Zhilina T.N., Bychkov A.Y., Bonch-Osmolovskaya E.A. (2020). Syntrophic growth of alkaliphilic anaerobes controlled by ferric and ferrous minerals transformation coupled to acetogenesis // ISME J. 14(2). P. 425-436.
19. Antonova A.V., Chistyakova N.I., Gracheva M.A., Rusakov V.S., Koksharov Y.A., Zhilina T.N., **Zavarzina D.G.** (2020). Mössbauer and EPR study of ferrihydrite and siderite biotransformations by a syntrophic culture of alkaliphilic bacteria // Journal of Molecular Structure, Vol. 1206. 127606. DOI:10.1016/j.molstruc.2019.127606.
20. **Zavarzina D.G.**, Zhilina T.N., Kostrikina N.A., Toshchakov S.V., Kublanov I.V. (2020). *Isachenkonkia alkalipeptolytica* gen. nov. sp. nov., a new anaerobic, alkaliphilic proteolytic bacterium capable of reducing Fe(III) and sulfur // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. Vol. 70. P. 4730-4738.
21. **Zavarzina D.G.**, Merkel A.Yu., Klyukina A.A., Elizarov I.M., Pikhтерева V.A., Rusakov V.S., Chistyakova N.I., Ziganshin R.H., Maslov A.A., Gavrilov S.N. (2023). Iron or sulfur respiration – an adaptive choice determining the fitness of a natronophilic bacterium *Dethiobacter alkaliphilus* in geochemically contrasting environments // Front. Microbiol. DOI:10.3389/fmicb.2023.1108245.

Тезисы конференций

22. **Zavarzina D.G.**, Chistyakova N.I., Kolganova T.V., Tourova T.P. Dissimilatory Fe(III)-reduction in alkaline environment // Abstracts of 11th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-11). 2006. August 20-25, Vienna, Austria, p. 77.
23. Zhilina T.N., **Zavarzina D.G.**, Tourova T.P. New alkaliphilic peptolytic, Fe(III)-reducing bacteria from soda lakes // Abstracts of 12th International Symposium on microbial ecology (ISME-12). 2008. August 17-22, Cairns, Australia, p.208.
24. **Zavarzina D.G.**, Chistyakova N.I., Rusakov V.S., Zhilina T.N., Formation of iron minerals by alkaliphilic dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium *Geoalkalibacter rerrihydriticus* // Abstracts of 12th International Symposium on microbial ecology (ISME-12). 2008. August 17–22, Cairns, Australia, p.103.
25. Чистякова Н. И., Русаков В. С., Назарова К. А., Шапкин А. А., **Заварзина Д. Г.**, Жилина Т.Н. Исследование процессов образования минералов железа диссимилиаторными бактериями методами Мёссбауэровской спектроскопии // Тезисы XI Международная конференция “Мёссбауэровская спектроскопия и ее применение“. 2009. 1–5 июня, Екатеринбург, Россия, с. 142.
26. Chistyakova N.I., Rusakov V.S., Nazarova K.A., Shapkin A.A., Zhilina T.N., **Zavarzina D.G.** Mössbauer study of formation iron oxides and carbonate by dissimilatory alkaliphilic bacterium // Abstracts of International conference on the applications of the Mössbauer effect. 2009. July 19-24, Vienna, Austria, p.179.
27. Zhilina T.N., **Zavarzina D.G.**, Tourova T.P. Isolation of the first hydrogenotrophic alkaliphilic homoacetogenic bacteria from soda lakes Tanatari (Altay Region, Russia) // Abstracts of 8-th International Congress on Extremophiles. 2010. September 12-16, Ponta Delgada, Azores, Portugal, p. 240.
28. **Zavarzina D.G.**, Zhilina T.N., Kolganova T.V., Chistyakova N.I. New alkaliphilic Iron reducing acetate- and hydrogen-utilizing bacterium isolated from Lake Magadi (Kenia) // Abstracts of 8-th International Congress on Extremophiles. 2010. September 12-16, Ponta Delgada, Azores, Portugal, p. 239.
29. **Заварзина Д. Г.**, Жилина Т. Н. Анаэробные сообщества содовых озер как аналоги палеоконтинентальной микробиоты докембрия // Конференция ПИН РАН «Ранняя колонизация суши». 2010. 17–19 ноября, Москва, Россия, с. 3.
30. **Zavarzina D.**, Savenko A., Chistyakova N., Shapkin A., Zhilina T. and Zavarzin G. Release of silica from micas by alkaliphilic anaerobes // Abstracts of 21st Annual V.M. Goldschmidt Conference. 2011. August 11-14, Prague, Czech Republic, p. 3096.

31. Chistyakova N.I., Rusakov V.S., Shapkin A.A., Zhilina T.N., **Zavarzina D.G.** Mössbauer study of Iron reduction process in glauconite and biotite by dissimilatory alkaliphilic bacterium // Abstracts of ICAME. 2011. September 25-30, Kobe, Japan, p.213.
32. **Заварзина Д.Г.**, Жилина Т.Н. Анаэробные сообщества содовых озер как аналоги палеоконтинентальной микробиоты докембрия. С. 69-91 // Ранняя колонизация суши / Отв. ред. Рожнов С.В. Сер. “Гео-биологические процессы в прошлом” Москва, ПИН РАН. 2012. 194 с. ISBN 978-5-903825-21-9.
33. Жилина Т.Н, **Заварзина Д.Г.** Ацетатная метабиотическая система в анаэробном микробном сообществе содовых озер. С. 119-142 // Проблемы эволюции биосферы. Отв. ред. С.В. Рожнов Сер. “Гео-биологические процессы в прошлом“ М. ПИН РАН 2013. 340с. ISBN 978-5-903825-31-8
34. **Zavarzina D.**, Zhilina T.N., Shapkin A.V., Chistyakova N.I. *Geoalklibacter ferrihydriticus* and its interaction with minerals and other microorganisms // Abstracts of 10-th International Congress on Extremophiles. 2014. September 8-13, Saint Petersburg, Russia, p.116.
35. Zhilina T.N., **Zavarzina D.G.**, Shapkin A.A. Reduction of chemically synthesized ferrihydrite – a new physiological ability of hydrogenotrophic alkaliphilic homoacetogenic bacteria of genus *Fuchsiella* // Abstracts of 10-th International Congress on Extremophiles. 2014. September 8-13, Saint Petersburg, Russia, p.149.
36. **Заварзина Д.Г.**, Чистякова Н. И., Грачева М. А., Антонова А. В., Чернов М. С. Меркель А. Ю., Жилина Т. Н. Синтрофное взаимодействие алкалофильных анаэробных бактерий *Geoalkalibacter ferrihydriticus* и *Candidatus “Contubernalis alkalaceticum”* // Тезисы 1-го Российского Микробиологического Конгресса. 2017. 17-18 октября, Пущино, Россия, с. 46.
37. Zhilina T. N., **Zavarzina D. G.**, Kublanov I. V. *Isachenkonkia alkalipeptolytica* gen. nov. sp. nov., a new anaerobic, alkiliphilic organotrophic bacterium isolated from a soda lake and able to reduce synthesized ferrihydrite // Abstracts of XXXVII Annual Meeting of the European Culture Collections' Organisation, Conference Proceedings. 2018. September 13-15, Moscow, Russia. pp. 132-133.
38. Antonova A., Chistyakova N., Gracheva M., Ermolaev N., Koksharov Yu, Rusakov V., **Zavarzina D.**, and Greneche J-M. Investigations of siderite, magnetite and ferrihydrite transformations by syntrophic culture // Abstracts of 5th Mediterranean Conference on the Applications of the Mossbauer Effect and 41st Workshop of the French speaking Group of Mossbauer Spectroscopy. 2019. May 20, Montpellier, France, p. 107.

39. Gracheva M.A., Chistyakova N.I., Antonova A.V., Trifonova V.K., Koksharov Yu A., Kiseleva T.Yu, **Zavarzina D.G.**, Gavrilov S.N., Rusakov V.S. Biogenic transformations of siderite and iron wire under anaerobic conditions // Abstracts of 5th Mediterranean Conference on the Applications of the Mossbauer Effect and 41st Workshop of the French speaking Group of Mossbauer Spectroscopy. 2019. May 20, Montpellier, France, p. 145.
40. **Заварзина Д.Г.**, Кочеткова Т.В., Чистякова Н.И., Грачева М.В., Меркель А.Ю., Перевалова А.А., Бонч-Осмоловская Е.А., Бычков А.Ю., Гаврилов С.Н. Анаэробное окисление сидерита термофильными микробными сообществами // Тезисы 2-го Российского Микробиологического конгресса. 2019. 23–17 сентября, Саранск, Россия, с. 52.
41. **Заварзина Д.Г.** Анаэробный цикл железа в алкалофильных микробных сообществах // Тезисы 3-го Российского Микробиологического конгресса. 2021. 26 сентября — 1 октября, Псков, Россия, с. 28.
42. **Заварзина Д.Г.**, Клюкина А.А., Меркель А.Ю., Комлева Д.И., Чистякова Н.И., Русаков В.С., Гаврилов С.Н. Трансформация минералов железа под воздействием алалофильных анаэробных бактерий // Тезисы Конференции «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний». 2023. 3–7 июля, Улан-Удэ Россия, в печати.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Биогеохимический цикл железа

1.1.1. Геохимия железа

Железо – четвертый по распространенности элемент на Земле; его кларк в земной коре составляет 4.37% (Ронов и др., 1990). По геохимической классификации железо может быть отнесено как к сидерофильным, так и к халькофильным элементам, поскольку имеет химическое сродство к углероду, кремнию, сере и фосфору. Следствием этого свойства является то, что наиболее распространенными минералами железа, помимо оксидов, являются силикаты, карбонаты, сульфиды и фосфаты (Перельман, 1989; Ронов и др., 1990). Другим важнейшим свойством железа, определяющим его геохимию, является переменная степень окисления и нахождение его в природе в двух- и трехвалентном состоянии. Металлическое железо, вместе с никелем, составляет ядро Земли и в земной коре практически не встречается. В магматических и метаморфических породах железо представлено в основном силикатами (оливины $(Mg,Fe)_2[SiO_4]$, пироксены), оксидами (магнетит, Fe_3O_4), сульфидами (пирит FeS_2 , пирротин FeS) или карбонатами (сидерит $FeCO_3$), в которых оно в большинстве случаев содержится в восстановленной двухвалентной форме. Близость кристаллохимических свойств иона Fe^{2+} к ионам Mg^{2+} и Ca^{2+} определяет частые изоморфные замещения этих элементов во многих силикатах. Важно отметить, что более тяжелые основные и ультраосновные магматические породы – базальты, перидотиты, диабазы – обогащены железосодержащими минералами и содержат от 6 до 16 % железа, в то время как кислые изверженные породы – гнейсы, граниты – ими обеднены и содержат всего 2.7-3.0 % железа (Ковда, 1985; Ронов и др., 1990). В верхних частях литосферы и в зоне гипергенеза существенную роль начинают играть минералы, содержащие трехвалентное железо, относящиеся в основном к классу оксидов и гидроксидов, такие как гематит (Fe_2O_3), гетит ($\alpha-FeOOH$), маггемит ($\gamma-Fe_2O_3$), лепидокрокит ($\gamma-FeOOH$), ферригидрит ($5Fe_2O_3 \times 9H_2O$) и акаганеит ($\beta-FeOOH$), которые образуются за счет процессов выветривания изверженных и метаморфических пород, приводящим к окислению минералов, содержащих двухвалентное железо (силикатов, карбонатов, сульфидов, фосфатов). При этом в осадочных породах, в почвах и водоемах, где формируются восстановительные условия, возможно вторичное накопление и восстановленных минералов этого элемента.

Железная руда является третьим по массе добываемым в мире полезным ископаемым (Cooper et al., 2018), при этом 98% извлеченной железной руды используется для производства стали (Yellishetty et al., 2012). В конце жизненного цикла любого техногенного материала он

может либо утилизироваться, либо пойти на вторичную переработку, вернувшись, таким образом, в цикл антропогенных материалов. Поскольку сталь существенно не изменяет присущих ей свойств, она особенно подходит для второго варианта и, таким образом, в высокой степени используется вторично. Однако неустойчивость металлического железа при взаимодействии с водой и/или кислородом приводит к тому, что часть стали подвергается процессам химической или микробно-индуцированной коррозии и возвращается в литосферу в основном в виде окислов железа и сидерита, что, в свою очередь, вызывает антропогенное «ожелезнение» почв и верхней части литосферы (Mallinger and Mergili, 2022).

За последние 2 столетия за счет антропогенного вклада таким путем было внесено более 10 млрд. т железа, из которых более 60% находится в рассеянном виде. По этим же данным, ежегодно в окружающую среду поступает в различной форме около 0.25 млрд. т железа (Сысуев, 1980). Таким образом, в результате деятельности человека в верхней части литосферы и в почвах наблюдается аномальное присутствие металлического железа в виде различных стальных конструкций или в рассеянном виде, а также повышенное, по сравнению с природным, содержание окислов железа и сидерита.

1.1.2. Гидрохимия железа

Устойчивость и форма нахождения соединений железа определяется химическими свойствами его валентных состояний. Ионные радиусы для двух- и трехвалентного железа, которые, соответственно равны 0.80 и 0.67 Å, в большой степени определяют растворимость и формы миграции железа в водах (Бугаенко и др., 2008). Поскольку при уменьшении радиуса положительного иона и увеличении его заряда увеличиваются кислотные свойства соответствующих окислов, а при обратных соотношениях радиусов и зарядов ионов усиливаются основные свойства, простые ионы двухвалентного железа обладают большей миграционной способностью по сравнению с трехвалентным железом (Мейсон, 1971). Как известно, величина заряда иона непосредственно влияет на прочность связей в разновалентных соединениях. Поскольку с ростом валентности энергия решетки возрастает значительно быстрее, чем энергия гидратации, соединения трехвалентного железа менее растворимы. Уменьшение растворимости при увеличении валентности усиливается параллельным увеличением ковалентности связи, что определяет почти полную нерастворимость окислов, силикатов и других кислородсодержащих соединений трехвалентного железа. Растворимость минералов железа контролируется рН и резко повышается в кислых растворах. Кроме того, уголекислота активно повышает растворимость первичных железистых минералов, даже наиболее устойчивых из них – силикатов, оказывая,

таким образом, противоположное действие, чем кислород и сероводород (Албул, 1969; Труфанов, 1982).

В гидрогеохимии железа большое значение имеют процессы комплексообразования, которые существенным образом увеличивают его миграционную способность. Исключительный интерес для оценки подвижности железа имеют реакции гидролиза, которые определяются величиной рН и концентрацией гидроксильных ионов. Содержание растворенных, но недиссоциированных молекул $\text{Fe}(\text{OH})_2$ и $\text{Fe}(\text{OH})_3$ остается неизменным при всех значениях рН и лишь зависит от констант равновесия между растворенным железом и его твердой фазой (т.е. определяется ее растворимостью). Железо (III) имеет более высокую тенденцию к образованию комплексов, чем железо (II), причем последнее образует как правило, менее прочные комплексы (Нem and Cropper, 1962). В природных водах, содержащих кислород, ионы двухвалентного железа окисляются до трехвалентного, подвергаются гидролизу и выпадают в осадок. Кроме гидроксокомплексов, железо связывается с различными органическими лигандами, из которых наибольшее значение имеют гуминовые вещества, которые позволяют удерживать его в растворе в достаточно высоких концентрациях при близнеитральных значениях рН (Millero et al., 1995; Жаркынбаева и др., 2022). Все вышеперечисленные особенности химических свойств валентных форм железа позволяют сделать вывод, что в отсутствие кислорода при $\text{pH} \geq 8.0$ растворимость, как двух-, так и трехвалентной формы настолько мала, что при рассмотрении микробных процессов в этой области, протекающих с участием железа в качестве донора или акцептора электронов, его растворенными формами можно пренебречь. Таким образом, фактически, алкалофильные микроорганизмы могут использовать только нерастворимые формы железа – минералы.

Для работы с минералами железа и оценки возможности вовлечения их в биогеохимические реакции удобным инструментом оказываются диаграммы устойчивости минералов, построенные в координатах Eh-рН, а также трехмерные диаграммы с добавлением влияния парциального давления углекислоты или сероводорода, приведенные на рисунке 1 (Гаррелс и Крайст, 1968). Из расчетов диаграмм растворимости большого числа соединений железа следует, что наименьшей растворимостью в воде характеризуется гидроксид Fe^{3+} , выпадение которого наблюдается в диапазоне рН 2.3–3.4, в то время как гидроксид Fe^{2+} устойчив до нейтральных и слабощелочных значений рН 5.8-7.8. Область, ограниченная рН 5.0 и 8.0 и Eh 0.3 и 0.5 мВ на рисунке 1, включающее в себя большую часть диапазона, который наблюдается в природных водах, подверженных воздействию атмосферы, полностью приходится на поле устойчивости гематита. Поле устойчивости остальных оксидов и гидроксидов железа, в частности, ферригидрита, занимало бы на диаграмме меньшую

площадь. Высокая устойчивость гематита, охватывающая область от умеренно кислой окислительной среды до сильно восстановленных нейтральных и щелочных условий, наряду с особенностями его кристаллической решетки, определяет его высокую устойчивость к микробному воздействию (Lovely et al., 2004; Bonneville et al., 2009).

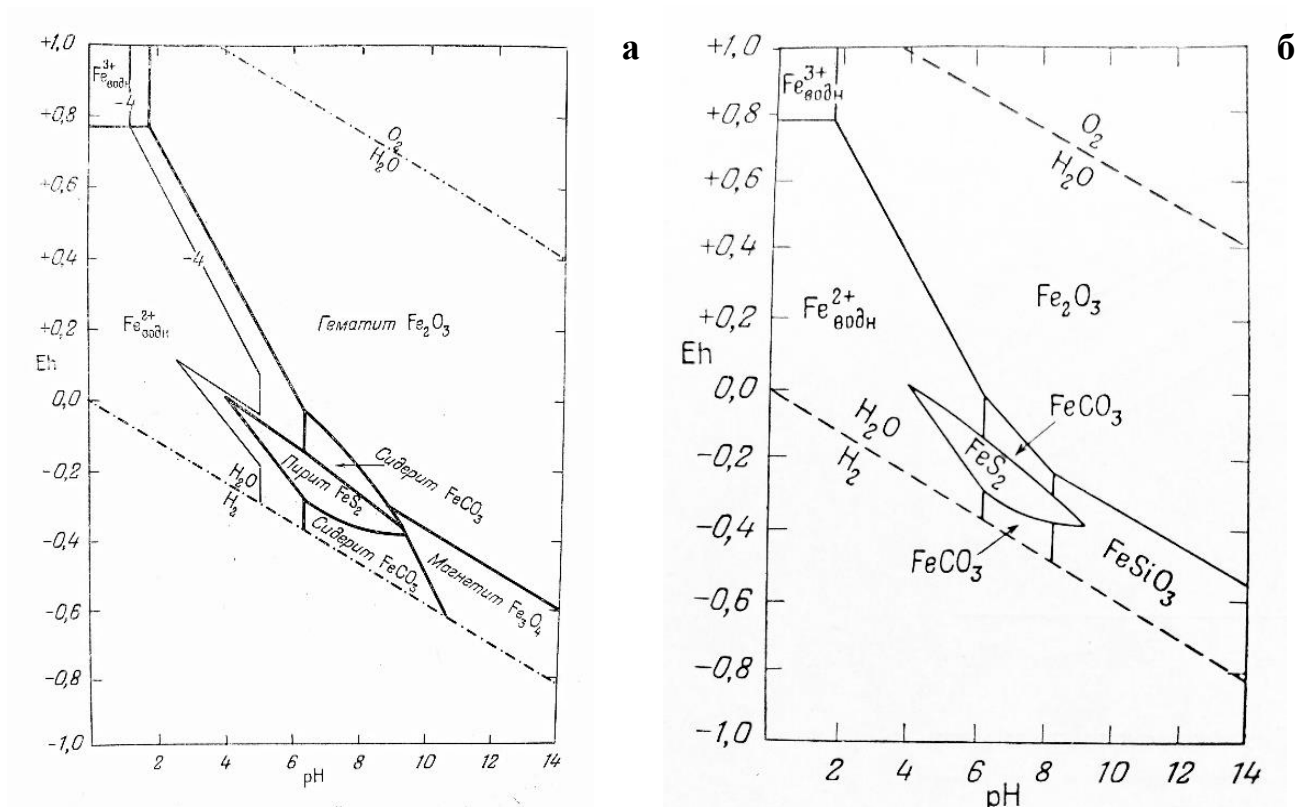


Рисунок 1. Соотношение устойчивости минералов железа в воде при 25 °C и 1 атм при (а) суммарной активности форм серы 10^{-6} , CO_2 10^0 ; (б) суммарной активности форм серы 10^{-6} , CO_2 10^0 и равновесной концентрации аморфного кремнезема (Гаррелс и Крайст, 1968).

Анализ полей устойчивости остальных минералов железа (Рис.1), позволяет сделать вывод, что сидерит неравновесен по отношению к современной атмосфере и его образование возможно либо в восстановительных условиях в присутствии такого количества CO_2 , которое намного превышает современное, либо в щелочных условиях, когда в растворе преобладают ионы HCO_3^- и CO_3^{2-} . При этом при окислении сидерита будет происходить образование магнетита, имеющего более широкое поле устойчивости. Добавление в систему сульфида приводит к образованию пирита или пирротина, поля устойчивости которых накладываются на поле устойчивости магнетита и сидерита (Рис.1а). Добавление в систему кремнезема, приводит, к тому, что магнетит становится неравновесной фазой и, следовательно, его образование невозможно в системах, насыщенных относительно аморфного кремнезема (Рис.1б) (Гаррелс и Крайст, 1968). Подобные построения, выполненные для стандартных

условий и определенных активностей карбоната, серы и кремнезема, позволяют сделать несколько важных выводов относительно устойчивости минералов железа в природе. Во-первых, наглядно видно, что в восстановительных щелочных условиях возможно существование, как окисленных (гематит, магнетит), так и восстановленных (сидерит, пирит, пирротин, силикаты железа) форм железа. Во-вторых, поля устойчивости определенных минеральных фаз в этой области напрямую зависят от концентраций карбонатов, сульфида, кремнезема и могут значительно изменяться относительно приведенных расчетных значений. Из этого следует, что щелочные восстановительные условия являются областью метастабильности наиболее распространенных в природе минералов железа, а определение направленности химических реакций с участием этих минералов требуют проведения термодинамических расчетов для конкретных природных или экспериментальных условий. Исходя из всего вышеизложенного, можно предположить, что применительно к микроб-минеральным взаимодействиям в щелочных восстановительных условиях возможны реакции с участием, как трех-, так и двухвалентного железа, поскольку известно, что микроорганизмы развиваются в поле устойчивости продукта окислительно-восстановительной реакции, используемой ими в качестве энергодающей (Заварзин, 1972) и могут существенно влиять на изменение локальных физико-химических параметров среды.

1.1.3. Минералы железа, вовлеченные в микробную трансформацию

Ферригидрит ($\text{Fe}_{10}\text{O}_{14}(\text{OH})_2$) - широко распространенный оксигидроксид железа, впервые описанный Ф.В. Чухровым в 1971 г. (Чухров и др., 1973) и образующейся как химически при осаждении гидроксида железа, так и биологически, в основном за счет жизнедеятельности железобактерий родов *Galionella* и *Leptothrix* (Заварзин, 1972).

Важнейшим свойством ферригидрита, обеспечивающим его исключительно высокую вовлеченность в процессы микробной трансформации, является наноразмерность его кристаллов, что обеспечивает высокую площадь поверхности в несколько сотен квадратных метров на грамм (Hiemstra and Van Riemsdijk, 2009). Из-за мелкого размера частиц и отсутствия возможности получения синтетического хорошо раскристаллизованного материала структура ферригидрита до сих пор остается дискуссионной. В спектроскопии он классифицируется по степени кристаллизации: ферригидрит с двумя линиями в рентгеновской дифрактограмме («двухлинейчатый») и шестью («шестилинейчатый»), «six lines» и «two lines». Появление двух или шести линий обусловлено размером частиц или степенью кристаллизации (Jambor and Dutrizac, 1998). Вопрос о катионном распределении в ферригидрите по-прежнему остается открытым. Анализ спектров рентгеновского поглощения

(X-ray absorption fine structure - XAFS) оксидов и гидроксидов железа позволил сделать вывод, что в ферригидрите, кроме октаэдрических позиций железа, существуют и тетраэдрические позиции, на которые приходится не более 20% атомов железа (Michel et al., 2007). Идеальная структура ферригидрида содержит три неэквивалентные позиции атомов железа: две в окружении шести атомов кислорода (октаэдрическая позиция) и одну в окружении четырех атомов кислорода (тетраэдрическая позиция) (Hiemstra, 2013). Важно отметить, что малые частицы ферригидрита являются суперпарамагнитными, причем значение сверхтонкого магнитного поля чрезвычайно сильно зависит от размера частиц (Duarte et al., 2006), таким образом, ферригидрит может быть использован микроорганизмами как посредник при межвидовом переносе электронов.

Структурные особенности ферригидрита определяют его неустойчивость и метастабильность. Он является минералом-предшественником гематита и гетита, перекристаллизация в которые происходит самопроизвольно в зависимости от локальных физико-химических условий, путем агрегационного роста кристаллов (Cudennec and Lecerf, 2006; Das et al., 2011). В восстановительных условиях, таких как глеевые горизонты или донные осадки, обедненные кислородом, в зависимости от условий, ферригидрит может восстанавливаться в магнетит, фужерит или сидерит, причем существенную роль в этом процессе играют микроорганизмы. Метастабильность ферригидрита и его поверхностные свойства делают его идеальным кандидатом для использования в качестве акцептора электронов диссимиляционными железоредукторами и модельным объектом большинства лабораторных экспериментов микробиологов, начиная со времен открытия этого процесса (Балашова и Заварзин, 1980) и описания первого диссимиляционного железоредуктора *Geobacter metallireducens* (Lovely et al., 1993).

Магнетит (Fe₃O₄) - один из важнейших рудных минералов железа, встречающийся в магматических, метаморфических и осадочных породах (Grant, 1985), имеет как хемогенное, так и биогенное происхождение. В последнем случае он может образовываться за счет реакций хемосинтеза или внутриклеточно у магнетотактических бактерий (Goswami et al., 2022).

Магнетит имеет структуру обращенной шпинели. Решетка шпинели состоит из двух неэквивалентных подрешеток: тетраэдрической (А) и октаэдрической (В). В идеальном случае в А-подрешетке находятся только атомы Fe³⁺, окруженные четырьмя атомами кислорода, а в В-подрешетке – атомы Fe²⁺ и Fe³⁺ в окружении шести атомов кислорода. Показано, что при температуре выше температуры Вервея ($T_v \sim 120$ К) в магнетите происходит быстрый обмен электронов между соседними атомами Fe³⁺ и Fe²⁺, находящихся в октаэдрическом окружении. Таким образом, такие ионы Fe ведут себя как два иона Fe^{2.5+} (Wright et al., 2002; Piekartz et al.,

2006). Перескоковые электроны магнетита, наряду с катионами Fe^{2+} и Fe^{3+} , вносят существенный вклад в формирование его электропроводности и магнитных свойств (Белов, 2000). Магнетиту свойственна нестехиометричность – отклонение от соотношения атомов Fe^{2+} и Fe^{3+} как 2:1, а также дефектность структуры (Согмак, 1983). Обнаружено, что вакансии в магнетите расположены хаотично и преимущественно в В-позициях (Gorski and Scherer, 2010). В предельном случае, когда магнетит полностью окислен, он трансформируется в минерал **маггемит** ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Стехиометрия магнетита влияет на химические и физические свойства частиц этого минерала, такие как абсорбционная способность, окислительно-восстановительный потенциал и кристаллическая структура (Gorski and Scherer, 2010).

В Мёссбауэровском спектре хорошо раскристаллизованного магнетита, измеренном при комнатной температуре, наблюдается только два зеемановских секстета. Один из них соответствует атомам железа в А-подрешетке, второй - атомам железа в В-подрешетке, со степенью окисления ≈ 2.5 из-за механизма Вервея (Piekarz et al., 2006). В спектре хорошо раскристаллизованного маггемита, измеренном при комнатной температуре, также наблюдаются два секстета с параметрами, близкими к параметрам спектра магнетита. Поэтому при комнатной температуре различить нестехиометрический магнетит и смесь нестехиометрического магнетита и маггемита практически невозможно, и для определения состава магнитоупорядоченной фазы необходимо проводить низкотемпературные измерения (Da Costa et al., 1998; Goya et al., 2003). Показано, что чем меньше размер кристаллов магнетита, что характерно, например, для магнетита биогенного происхождения, тем быстрее происходит его окисление в маггемит (Salazar et al., 2011).

Поле устойчивости магнетита (Рис.1) в восстановительных условиях при нейтральных и щелочных значениях рН, а также наличие двух- и трехвалентных атомов железа в его структуре определяет его использование в реакциях хемосинтеза. Он является типичным продуктом, образующимся при восстановлении ферригидрита и других окисленных минералов железа диссимиляционными железоредукторами (Kostka and Nealson, 1995; Dong et al., 2000; Lovely et al., 2004) или при фото- или нитрат-зависимом окислении сидерита. Показано также использование его в качестве акцептора электронов с дальнейшим восстановлением в сидерит (Burne et al., 2015, 2016). С другой стороны, закисное железо, входящее в состав магнетита, может быть использовано, как донор электронов аноксигенными фототрофами, или при нитрат-зависимом анаэробном окислении (Burne et al., 2016; Hedrich et al., 2011; Ohenhen et al., 2022). Кроме того, показано, что благодаря своей высокой электропроводности, магнетит играет существенную роль при межвидовом переносе электронов, существенно стимулируя синтрофное взаимодействие бактерий в метантенках (Kato et al., 2012a), или при прямом переносе электронов (Kato et al., 2012b, 2012c, 2013; Liu et

al., 2015). Таким образом, магнетит можно рассматривать как минерал-медиатор, являющийся связующим звеном восстановительной и окислительной частей биогеохимического цикла железа.

Сидерит (FeCO_3) - железосодержащий карбонат, широко распространенный на Земле, встречающийся в осадочных, метаморфических и метасоматических породах, образующийся в результате гидротермальных процессов (Birkett, 2003; Булах и др., 2008). Сидерит гидротермального происхождения встречается в виде самостоятельных мономинеральных сидеритовых жил или входит в состав полиметаллических руд. В осадочных породах конкреции, линзы и прослои сидерита образуются в ходе диагенетических и катагенетических преобразований железосодержащих осадков с участием органического вещества, обеспечивающего восстановление трехвалентного железа (Холодов и Бутузова, 2004 а, б).

Сидерит имеет ромбическую решетку типа кальцита. Для него характерны ромбоэдрические кристаллы, однако кристаллы сидерита осадочного или биогенного происхождения часто имеют сферическую оолитовую форму (Roh et al., 2003; Заварзина, 2004; Köhler et al., 2013). Измеренный при комнатной температуре, Мёссбауэровский спектр сидерита представляет собой один квадрупольный дублет, типичный для соли Fe^{2+} (Murad, 1998). Сидерит ведет себя как парамагнетик выше температуры Нееля (39 К); ниже этой температуры сидерит является антиферромагнетиком (Alikhanov, 1959), и, таким образом не может быть использован микроорганизмами как посредник в процессе межвидового переноса электрона.

Образование сидерита как продукта восстановления оксидов и гидроксидов железа показано при жизнедеятельности железоредуцирующих прокариот (Zachara et al., 1998; Чистякова и др., 2003; Roh et al., 2003; Lovely et al., 2004; Zavarzina et al., 2007; Lin et al., 2020). Его образование зависит от физико-химических параметров среды, таких как парциальное давление углекислоты, рН, химический состав среды, температура и время инкубации, исходное количество минеральных фаз (Fredrickson et al., 1998; Roh et al., 2003; Заварзина, 2004; Kukkadapu et al., 2005). С другой стороны, сидерит является донором электронов для аноксигенных фототрофных бактерий при нитрат-зависимом окислении железа (Straub et al., 1996, Kappler and Newman, 2004; Ehrenreich and Widdel, 1994).

Зеленая ржавчина (green rust) – общее название минералов, представляющих собой фазы $\text{Fe}^{2+}\text{-Fe}^{3+}$, состоящие из положительно заряженных гидроксидных слоев $\{\text{Fe}^{2+}_{(1-y)}\text{Fe}^{3+}_y(\text{OH})_2\}^{y+}$, разделенных прослойкой анионов (A^{n-} : CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , Cl^-) и молекулами воды $\{(y/n)\text{A}^{n-}m\text{H}_2\text{O}\}^{x-}$ (Drissi et al., 1995; Simon et al, 2003). Показано, что для зеленой ржавчины наиболее предпочтительным является вхождение в структуру карбонат-иона

(Miyata, 1983), поэтому гидроксикарбонаты железа являются наиболее распространенными минералами этой группы. Гидроксикарбонаты железа различают по окислительно-восстановительным свойствам: наиболее восстановленная фаза **фужерит** $\text{Fe}^{2+}_4\text{Fe}^{3+}_2(\text{OH})_{12}\text{CO}_3 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ($x = 0.33$), требурденит $\text{Fe}^{2+}_2\text{Fe}^{3+}_4(\text{OH})_{10}\text{CO}_3 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ($x = 0.67$) и полностью окисленный минерал мессбаурит $\text{Fe}^{3+}_6(\text{OH})_8\text{CO}_3 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ($x = 1$) (Genin et al., 2014), где $x = [\text{Fe}^{3+}]/[\text{Fe}_{\text{общ}}]$. Мёссбауэровская спектроскопия позволяет достоверно оценивать стехиометрию соединений зеленой ржавчины из отношения площади парциальных спектров, параметры которых соответствуют двух- и трёхвалентным атомам железа в структуре минералов и, следовательно, позволяют идентифицировать степень восстановленности минералов (Génin et al., 2014). По магнитным свойствам фужерит и мессбаурит относятся к ферромагнетикам (Rusch et al., 2008). Все минералы группы зеленой ржавчины кристаллизуются в гексагональной сингонии. Для минералов группы фужерита характерно образование таблитчатых гексагональных призм диаметром около 1 мкм (Legrand et al. 2001).

Несмотря на то, что исследования структуры и реакционной способности минералов этого семейства значительно расширились за последнее десятилетие, по сравнению с другими оксидами и гидроксидами железа они исследованы недостаточно. Впервые идентифицированные в природе в глеевом горизонте (Trolard et al., 1997), эти минералы были обнаружены лишь в относительно небольшом количестве природных объектов - грунтовых водах, шахтах, железистых озерных осадках (Johnson et al., 2015). Причиной сложности обнаружения соединений зеленой ржавчины в природе является их метастабильность. Они обладают высокой реакционной способностью, и при контакте с кислородом быстро окисляются в ферригидрит (Etique et al., 2016; Usman et al., 2018). Это свойство и наличие атомов двух- и трехвалентного железа позволяет микроорганизмам использовать минералы этой группы в окислительно-восстановительных реакциях как в качестве донора электронов (Pantke et al., 2012; Han et al., 2020), так и в качестве акцептора электронов (Kukkadapu et al. 2005; O'Loughlin et al., 2007; Etique et al., 2016). Кроме того, минералы группы зеленой ржавчины могут образовываться абиотически, например, в результате окисления $\text{Fe}(\text{OH})_2$ (Génin et al. 2014) и взаимодействия растворенного Fe^{2+} с оксидами железа (Ruby et al. 2006; Usman et al., 2018) или как продукт коррозии стальных конструкций (Refait et al., 2006). Таким образом, минералы группы фужерита, как и магнетит, в биогеохимическом цикле железа представляют собой медиаторы, связующие окислительную и восстановительную ветви цикла.

Биотит $(\text{K}(\text{Fe},\text{Mg})_3[\text{AlSi}_3\text{O}_{10}](\text{OH},\text{F})_2)$, является наиболее распространенным минералом слюд, составляющим 2.5—3% земной коры. Биотитом называются обычно ферродоминантные члены изоморфного ряда флогопит — аннит, где флогопит содержит

только катионы магния, а аннит - только катионы железа. Химический состав биотита весьма изменчив и включает окись калия (K_2O) 4.5—8.5%, окись магния (MgO) 0.3—28%, закись железа (FeO) 2.8—27.5%, окись железа (Fe_2O_3) 0.3—20.5%, окись алюминия (Al_2O_3) 9.5—31.5%, окись кремния (SiO_2) 33—45%, воду (H_2O) 6—11.5%, а также примеси окисных соединений титана, натрия, ванадия, лития, марганца, бария, стронция, цезия и других элементов-примесей (Булах и др., 2008). Биотит имеет разнообразное происхождение, но в основном это эндогенный минерал, являющийся главной составной частью кислых изверженных пород, таких как граниты, гранодиориты, трахиты. Широко распространен в некоторых метаморфических породах - кристаллических сланцах и гнейсах. Благодаря своей кристаллической структуре, мягкости и совершенной спайности, в процессе выветривания он подвергается быстрому разложению, в результате которого происходит гидратация, выносятся щелочи, а двухвалентное железо переходит в трехвалентное. В конечной стадии химического разложения образуются гидроокислы железа и глинистые минералы (Bray et al., 2015).

Как и другие минералы слюды, биотит имеет весьма совершенную спайность и состоит из гибких листов или пластин, которые легко отслаиваются. Биотит имеет кристаллическую структуру, описываемую как TOT-с, что означает, что он состоит из параллельных слоев TOT, слабо связанных друг с другом катионами (с). Слои TOT, в свою очередь, состоят из двух тетраэдрических слоев (Т), представленных на $\frac{3}{4}$ кремнеземными тетраэдрами $\frac{1}{4}$ алюминиевыми тетраэдрами, прочно связанными с двумя гранями одного октаэдрического слоя (О), с расположенными в нем катионами магния или железа в качестве обычных катионов. Тетраэдрические слои имеют сильный отрицательный заряд, поскольку их основной состав - $AlSi_3O_{10}^{5-}$, в то время как триоктаэдрические слои имеют положительный заряд, поскольку его основной состав - $M_3(OH)_2^{4+}$ (где М - двухвалентный ион, например Fe^{2+}) Объединенный слой TOT имеет остаточный отрицательный заряд, поскольку его основной состав - $M_3(AlSi_3O_{10})(OH)_2^-$, который нейтрализуется межслойными ионами K^+ (Nesse, 2000).

В разрушении биотита существенную роль играют микроорганизмы, воздействующие на него путем сочетания физических и химических факторов, связанных, прежде всего, с механическим воздействием и локальным подкислением среды, являющегося следствием образования органических кислот в результате микробного или грибного метаболизма (Balogh-Brunstad et al., 2008, Bonneville et al., 2011). Кроме того было показано, что литотрофные Fe(II)-окисляющие, нитрат-редуцирующие бактерии могут расти в накопительной культуре за счет окисления Fe^{2+} , входящего в структуру биотита. В результате микробного окисления происходило высвобождение ионов Fe и K, которое осуществлялось путем прямого ферментативного окисления с последующей трансформацией минерала в

твердом состоянии (Shelobolina et al., 2012). Таким образом, хотя очевидно, что микроорганизмы могут участвовать в трансформации биотита, как опосредованно, так и за счет прямого воздействия, исследований, посвященных процессам микробной трансформации этого распространенного минерала железа крайне мало.

Глауконит $((K,Na)(Fe,Al,Mg)_2(Si,Al)_4O_{10}(OH)_2)$ является аутигенным минералом осадочного происхождения, образующимся почти исключительно в морских восстановительных условиях. Является диагностическим минералом, указывающим на морские мелководные условия, характерные для континентального шельфа с медленными темпами осадконакопления. Образуется в результате диагенетических изменений осадочных отложений, биохимического восстановления и последующих минералогических изменений железосодержащих слюд, таких как биотит, а также под влиянием бактериальных процессов деградации органических веществ, например, в раковинах моллюсков (Николаева, 1981). Для образования глауконита необходимы слабощелочные ($pH \geq 8.0$) и слабовосстановительные условия ($Eh -50$ мВ). Этот минерал, попадая в неравновесную, более восстановленную среду, подвергается изменению - восстановлению железа, и переходит в магнетит. Если же нормальный ход осадочного процесса нарушается перерывами в осадконакоплении или перемывами осадков, картина редукционного процесса резко искажается: в осадке окисляется железо, убывает количество сульфидов и $C_{орг}$, и резко возрастает количество трехвалентного железа. В этом случае глауконит, будучи неравновесным образованием, подвергается окислению, а при длительном перемыве и ожелезнению, когда возникают псевдоморфозы гидроокислов железа по глаукониту (Страхов, 1947).

В структурном отношении глауконит близок к биотиту, но относится к группе гидрослюд. Октаэдрическая сетка образована октаэдрами, связанными боковыми ребрами. В каждом октаэдре четыре вершины представлены атомами кислорода, а две другие заняты ОН-группами. Из-за электростатического отталкивания катионов октаэдрические сетки, как правило, искажены. В тетраэдрической сетке каждый тетраэдр имеет три общие вершины со смежными тетраэдрами, а четвертой вершиной связан с октаэдрической сеткой (Дриц и Коссовская, 1991).

Восстановленные морские осадки, для которых характерно образование глауконита, являются зоной активной жизнедеятельности микроорганизмов. Теоретически, этот минерал может быть подвергнут прямому окислению или восстановлению микроорганизмами, так как он содержит ионы двух- и трехвалентного железа. Однако сведения о возможности вовлечения его в процессы хемосинтеза на момент начала наших исследований отсутствовали.

1.1.4. Месторождения железа и их связь с жизнедеятельностью микроорганизмов

Формирование месторождений железа является следствием уникального сочетания физико-химических, геологических и геоморфологических условий, которые приводят к его накоплению и концентрированию в локально-ограниченном пространстве в то время, как глобально химические элементы стремятся к рассеянию (Страхов, 1963). По данным Геологической службы США (USGS, 2019), мировые разведанные запасы железной руды составляют порядка 178 млрд тонн. Основные месторождения железа находятся в Австралии, Бразилии, России, США, Канаде, Швеции, Венесуэле, Либерии, Украине, Франции, Индии. В России железо добывается на Курской магнитной аномалии (КМА), Кольском полуострове, в Карелии и в Сибири. Железо концентрируется в результате самых разнообразных геологических процессов: известны его месторождения, сформировавшиеся в результате магматических, гидротермальных, осадочных и метаморфических процессов. Важно, что все они имеют ярко выраженную приуроченность к геологической эпохе образования: докембрийские железорудные эпохи в высокой степени единообразны и характеризуются широким распространением железисто-кремнистых формаций (ЖКФ) и ассоциацией железорудных минералов с кремнием и карбонатами, тогда как фанерозойский период в отношении накоплений железных руд отличается фациально-генетической пестротой месторождений и ассоциациями железа с органическим веществом, карбонатами, кремнеземом, фосфатами и марганцеворудными скоплениями (Холодов и др., 2012). Подавляющая масса железных руд имеет первично-осадочное происхождение. При этом железо, сконцентрированное во всех осадочных месторождениях мира, согласно данным Н.М. Страхова (1963), составляет 0.0001 часть рассеянного, что, очевидно, необходимо учитывать при оценке вклада микробных процессов в процессы трансформаций минералов железа. Vogg (1995) выделяет 3 группы осадочных месторождений железа: (1) железистые кварциты; (2) железистые пиритовые и сидеритовые сланцы; (3) железистые латериты, озерно-болотные руды, железомарганцевые конкреции, магнетитовые, гематитовые и ильменитовые пески.

Очевидно, что из всех вышеперечисленных типов месторождений участие микроорганизмов цикла железа может обсуждаться только для некоторых месторождений осадочного генезиса, а именно, озерно-болотных руд, железомарганцевых конкреций и железистых кварцитов.

1.1.4.1. Озерно-болотные руды

Озерно-болотные руды представлены преимущественно бурожелезняковыми рудами, сложенными скоплениями гидрогётитовых жеод и оолитов в глинисто-песчанистых озёрно-

болотных отложениях. Такие руды широко распространены на Восточно-Европейской платформе (четвертичный возраст орудинения) и известны в Тульской и Липецкой областях (юрский возраст орудинения) (Холодов и др., 2012). Они характеризуются низким содержанием железа - до 30-40% и образуются при слабокислых и близнеитральных значениях рН в микроаэрофильных или аэробных средах. Основными минералами железа, характерными для озерных и болотных вод, являются швертманнит (оксигидроксисульфат железа; $\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_6\text{SO}_4$), обычно образующийся в диапазоне рН от 3 до 4, гетит, образующийся в более широком диапазоне рН (от 3.5 до 8.0) в результате перекристаллизации ферригидрита, вивианит ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \times 8\text{H}_2\text{O}$) и сидерит (Thelemann et al., 2016).

В 1836 году немецкий геолог Х. Г. Эренберг впервые сформулировал гипотезу, что донные отложения бурого железняка в болотах и водоемах являются результатом жизнедеятельности железобактерий. Большой вклад в развитие этой гипотезы внес Б.В. Перфильев, разработавший уникальную методику изучения «микробного пейзажа» с помощью капиллярного и щелевого пелоскопа, состоящего из набора плоских капилляров, имеющих по пять прямоугольных каналов, расположенных в один ряд. Пелоскопы помещались вертикально в ил, и микроорганизмы, развивающиеся в пелоскопах были доступны для наблюдения в живом виде под микроскопом (Перфильев, 1972). В результате им была убедительно доказана ведущая роль литотрофов в окислении и концентрировании железа и марганца на начальном этапе озерного осадочного рудоотложения на стадии диагенеза.

Благодаря тому, что отложения железа и марганца, тесно ассоциированные с железобактериями, служили четким индикатором места их развития и привлекали внимание исследователей, классические Fe- и Mn-окисляющие бактерии, принадлежащие к родам *Gallionella*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix* и *Clonothrix*, были описаны еще в девятнадцатом веке и являлись одними из первых объектов исследования микробиологов (Emerson et al., 2010). Тем не менее, сложности в культивировании этой группы микроорганизмов долгое время не позволяли сделать вывод об их метаболических возможностях. *Leptothrix ochracea*, описанная С.Н. Виноградским в конце 19 века — одна из наиболее распространенных нитчатых железобактерий, для которой доказано участие в формировании железистых руд. При отложении гидроокислов железа на чехлах этих бактерий происходит постепенное ограничение доступа закисного железа и кислорода, поэтому подвижные клетки оставляют старые чехлы и, выползая наружу, образуют новые. Пустые чехлы накапливаются, и таким образом происходит накопление охристых осадков в водоемах. Вес накопленного железа превышает вес самих клеток в сотни раз (Заварзин, 1972; Emerson et al., 2010). С.Н. Виноградский предположил, но так и не доказал, что *L. ochracea*, может получать

энергию от окисления Fe^{2+} в процессе автотрофного роста (Winogradsky, 1988). Позднее было показано, что микроорганизмам этого рода, присущ гетеротрофный тип обмена. Окисление Fe и Mn не имеет для них энергетического значения и не служит источником энергии для ассимиляции углекислоты, а используется для устранения ингибирующего действия перекиси водорода, выделяющейся при окислении органического вещества и подавляющее их дальнейшее развитие. Под действием каталазы перекись разлагается на воду и кислород, который, в свою очередь, окисляет растворенные в воде ионы Fe^{2+} и Mn^{2+} , вызывая их осаждение в виде гидроокислов на поверхности клеточных структур, в капсулах или чехлах (Заварзин, 1972; Дубинина, 1977; Пиневиц, 2005). Однако дальнейшие исследования с использованием как классических микробиологических, так молекулярных методов показали, что представители кластера *Leptothrix/Sphaerotilus* имеют существенные различия в физиологии культивируемых представителей этой группы, и в природных матах гетеротрофные виды *Leptothrix* или *Sphaerotilus* не являются обычными членами микробных сообществ железных матов (Emerson and Weiss, 2004; Fleming et al., 2011). Предполагается, что физиология *L. ochracea* может быть более тесно связана с другим семейством бетапротеобактерий, *Gallionellaceae*, состоящего из известных хемолитотрофных железобактерий родов *Gallionella* и *Sideroxydans*, широко распространенных в пресноводных Fe-окисляющих сообществах, для которых окисление железа является энергетическим процессом (Emerson et al., 2010). Недавние исследования разнообразия микробных сообществ железных осадков пресноводных водоемов показали, что значительная часть (10-25%) клонов рРНК в них кластеризуется в *Gallionellaceae*, притом, что в структурном отношении большую часть железистых отложений составляют чехлы типа *L. ochracea*, морфологически сильно отличающиеся от стеблей, характерных для *G. ferruginea* (Duckworth et al., 2009; Blöthe et al., 2009a,b; Bruun et al., 2010; Fleming et al., 2011). Невозможность получения чистой культуры *L. ochracea* не позволяет сделать однозначный вывод о метаболизме этой бактерии. Клетки *L. ochracea* выделяют большое количество полисахаридного матрикса для образования чехла, что означает, что этот организм окисляет большое количество железа по отношению к производимой биомассе клеток. Исследования с накопительными культурами *L. ochracea* при проточном культивировании показали, что, в отличие от гетеротрофных представителей *Leptothrix/Sphaerotilus*, для ее роста требуется значительное количество закисного железа, что косвенно указывает на использование железа для энергетического обмена (Winogradsky, 1988; Mulder and van Veen, 1963; Fleming et al., 2011).

Таким образом роль железобактерий в образовании озерно-болотных руд сводится к двум функциям: 1) концентрированию и освобождению Fe и Mn на полисахаридном матриксе при использовании их как антиоксидантов; 2) окислению двухвалентного железа в

трехвалентное, а двухвалентного марганца в трех — и четырехвалентные формы, при использовании их в реакциях катаболизма. Важно отметить, что, если обратиться к диаграмме устойчивости минералов железа (Рис.1), становится очевидно, что железобактерии развиваются в поле устойчивости гематита/ферригидрита, а окисление закисного железа в условиях близонейтральных значений pH при наличии кислорода происходит самопроизвольно. Именно поэтому, представители этой группы микроорганизмов являются микроаэрофилами, занимая узкую зону окислина, в которой они могут конкурировать с процессом химического окисления железа и марганца.

1.1.4.2. Железомарганцевые конкреции

Железомарганцевые конкреции (ЖМК) образуются как в пресноводных, так и в морских условиях, но масштабы этих процессов несопоставимы. Чтобы оценить запасы железа и марганца, сосредоточенные в ЖМК океана, достаточно сказать, что они покрывают около 50% абиссального дна Тихого океана и центральной части Индийского океана (Hein and Koschinsky, 2014). ЖМК образуются на покрытых осадочными отложениями абиссальных частях дна океанов на глубинах 4000-6500 м, с низкой скоростью осадконакопления (несколько мм или см/млн. лет), в аэробных условиях при pH 8.0-8.5. Рудное вещество ЖМК почти полностью состоит из оксидов и гидроксидов железа и марганца. Среди марганцевых минералов преобладает пиролюзит (MnO_2), рудные минералы железа представлены оксидами и гидроксидами - гетитом, акагенином, лепидокрокитом, фероксигитом (δ -FeOOH). Проблеме генезиса ЖМК посвящено огромное количество работ как отечественных, так и зарубежных геологов, однако, до сих пор она далека от окончательного решения (Батулин, 1990; Железомарганцевые корки..., 1990; Савенко, 2004; Hein and Koschinsky, 2014; Hein et al., 2020). До недавнего времени считалось, что образование соединений марганца в ЖМК возможно при осаждении оксидов и гидроксидов марганца из морской воды, однако экспериментальные работы последних лет показали, что двуокись марганца имеет относительно высокую растворимость – около 10^{-6} моль/л при pH 6-8, что в 1000 раз превышает концентрацию марганца в океанической воде (Савенко, 1989), в связи с чем возникает необходимость объяснения причины выпадения марганца в осадок, а также ответа на вопрос, почему ЖМК не растворяются? Низкое содержание марганца и железа в морской воде на фоне относительно высокой концентрации марганца в иловых растворах океанических осадков, указывает на последние как на среду, в которой происходит рудообразование. Экспериментально подтвержденный факт резкой недосыщенности морской воды в отношении MnO_2 означает, что формирование конкреций происходит на стадии раннего диагенеза осадков, а высокая растворимость пиролюзита указывает на необходимость концентрации марганца, поскольку

только в этом случае возможно образование твердой фазы. Таким образом, очевидно, что в образовании ЖМК большую роль играют микроорганизмы цикла железа и марганца, которые могут обеспечить и концентрирование, и быстрое окисление Mn(II), за счет изменения локальных физико-химических условий среды и способности катализировать термодинамически выгодные, но исключительно медленно протекающие в абиогенных условиях химические реакции (Савенко, 2004). Живущие на границе раздела сред вода-дно железобактерии, окисляя Fe(II) и Mn(II), используют диффузионный поток этих элементов, выходящий из поверхностного слоя осадков в водную толщу. Оруденелые клетки после отмирания агрегируются в ЖМК, причем повышенные концентрации марганца в иловых водах способствуют сохранности конкреций, что объясняет парадокс роста конкреций на поверхности осадков при сильной недосыщенности морской воды по главным минеральным фазам (Савенко, 2004). В связи с развитием молекулярных методов в настоящее время накапливается все больше доказательств в пользу участия микроорганизмов в формировании ЖМК, хотя вопрос этот исследован явно недостаточно. Очевидно, что в данном процессе могут принимать участие как прокариоты, окисляющие Fe²⁺ и Mn²⁺, так и микроорганизмы, способные восстанавливать Fe³⁺ и Mn⁴⁺. Действительно, сравнительный анализ таксономического разнообразия в микробных сообществах ЖМК отобранных со дна разных частей Тихого океана (Wu et al., 2013; Blöthe et al., 2015; Shiraishi et al., 2016; Lindh et al., 2017; Shulge et al., 2017), Южно-Китайского (Jiang et al., 2019) и Карского морей (Shulga et al., 2022) выявил общее сходство структуры этих микробных сообществ. Доминирующими таксонами являются представители альфа- (порядки *Rhizobiales*, *Kilonellales* и *Rickettsiales*) и гаммапротеобактерий (порядки *Vibrionales* и *Xanthomonadales*), а также окисляющие аммоний археи из семейства *Nitrosopumilaceae* и представители некультивируемых прокариот. Все эти таксоны включают метаболически универсальные организмы, способные к хемоорганотрофии или аноксигенной фототрофии. При этом сравнительный корреляционный анализ микробных сообществ ЖМК Карского моря и подстилающих их донных осадков- выявил положительный отбор для предполагаемых металлоредукторов (*Thermodesulfobacteriota*), окислителей железа (*Hyphomicrobiaceae* и *Scalinduaceae*) (Shulga et al., 2022). Дополнительным аргументом в пользу существенной роли микроорганизмов в формировании ЖМК является большое количество фоссилизованных бактериальных клеток, инкрустированных минералами железа и марганца и обнаруженных при изучении тонкой структуры ЖМК методом сканирующей электронной микроскопии (Wang et al., 2012; Jiang et al., 2019; Shulga et al., 2022).

1.1.4.3. Железисто-кремнистые формации докембрия

Железистые кварциты относят к метаморфическим образованиям, хотя накопление их происходило преимущественно осадочным путем и лишь в дальнейшем они подверглись метаморфизации. Процесс образования докембрийских железорудных формаций по масштабам намного превышает фанерозойский, и эти породы, известные на всех континентах, являются обязательной составной частью основных метаморфических комплексов всех древних щитов, составляя около 60% мировых запасов железных руд ~ 96 млрд тонн (Bekker et al., 2010). Формирование железисто-кремнистых формаций (ЖКФ) происходило на протяжении большей части докембрия (от ~3800 до 545 млн лет назад), достигая максимума между 2700 и 2300 млн лет назад (Posth et al., 2011). В фанерозое, при накоплении кислорода в атмосфере и изменения химического состава воды в океане, образование этой формации прекратилось и стали отлагаться озерно-болотные и оолитовые железные руды (Страхов, 1963; Холодов и др., 2012).

ЖКФ представляют собой тонкопереслаивающиеся породы осадочного происхождения, содержащие более 15% железа. Все отложения железистых кварцитов имеют сходный состав, представленный основными минералами - кварцем (SiO_2), магнетитом (Fe_3O_4), гематитом (Fe_2O_3), сидеритом (FeCO_3) и грюнеритом ($(\text{Fe}^{2+}, \text{Mg})_6\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8$), а также минералами-примесями - членами доломит-анкеритового ряда ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2\text{CaFe}(\text{CO}_3)_2$), кальцитом (CaCO_3), стильпноmelаном ($\text{K}_{0,6}(\text{Mg}, \text{Fe}^{2+}, \text{Fe}^{3+})_6\text{Si}_8\text{Al}(\text{O}, \text{OH})_{27} \times 4\text{H}_2\text{O}$), рибекитом ($\text{Na}_2\text{Fe}_3^{2+}\text{Fe}_2^{3+}(\text{Si}_8\text{O}_{22})(\text{OH})_2$), пиритом (FeS_2) и пирротинном (Fe_{1-x}S) (Klein, 2005). Для ЖКФ характерна слоистость, образованная макрослоями (>2.54 см), мезослоями (1.7 мм~2.54 см), и микрослоями (0.3~1.7 мм), состоящими из перемежающихся преимущественно кремнистых или рудных слоев, а также отсутствие уловимых следов обломочного материала и глин (Bekker et al., 2010). По условиям формирования большинство ЖКФ можно отнести к месторождениям типа оз. Верхнего, отличающихся крупными размерами, локализующихся в узком стратиграфическом интервале и образовавшихся в спокойной обстановке (глубоководной или, наоборот, мелководной) осадочным путем, или месторождениям типа Алгома, относительно небольшим по размерам и явно ассоциирующимся с вулканитами и гидротермальным процессом (Posth et al., 2011).

Несмотря на большое количество исследований, посвященных вопросу генезиса ЖКФ, многие вопросы по-прежнему остаются дискуссионными. Наиболее остро стоят проблемы окисления закисного железа, которое большинством исследователей считается первичной формой этого элемента в ЖКФ, в отсутствии значимых количеств кислорода в докембрии, природа тонкой слоистости с присутствием как окисленных (гематит, магнетит), так и

восстановленных минералов железа (сидерит, магнетит), физико-химические условия, способствующие эффективной транспортировке и осаждению кремния, состав океанической воды и первичных минералов, и, наконец, степень участия микроорганизмов в формировании ЖКФ.

Приверженцы теригенно-осадочной гипотезы считают источником железа и кремнезема выветриваемые породы древней суши, в то время как в рамках вулканогенно-осадочной гипотезы распространены представления о поступлении железа и кремнезема при подводной вулканической деятельности (Posth et al., 2011). Однако следует отметить, что огромные количества Fe, накопленные в железистых формациях, могут быть объяснены только совместным вкладом осадочных и гидротермальных источников. Действительно, согласно расчетам Holland (1973), железные формации мира сформировавшиеся в период 2.5-2.0 млн лет назад, содержат приблизительно 2×10^{14} т железа. В настоящее время ежегодный приток Fe в мировой океан считается незначительным (9.47×10^8 т), в том числе 9.45×10^8 т, внесенных в силикатной и органоминеральной и только 0.02×10^8 т в виде растворов. Таким образом, становится ясно, что современные условия не подходят для объяснения докембрийских рудообразующих процессов. При реконструкции условий, существующих на континентах в докембрии, следует учитывать, что выветриваемые породы того времени – коматииты, вулканы архейских зеленокаменных поясов, содержали огромное количество Fe. Даже докембрийские гранитоиды по расчетам содержат приблизительно 13674 г/т магнетита, что на порядок выше, чем его среднее содержание в фанерозойских гранитоидах (Холодов и Бутузова, 2004). Согласно расчетным моделям разных исследователей, суммированным в обзоре (Catling and Zahnle, 2020) атмосфера в архее содержала $O_2 < 10^{-6}$ от современного, уровень N_2 был таким же, как сегодня, или, возможно, в несколько раз ниже, а уровень CO_2 и CH_4 был в ~ 10 -2500 и 10^2 - 10^4 раз выше современного, соответственно. Концентрация парниковых газов была достаточной, чтобы компенсировать более слабое Солнце. Умеренность климата за счет углеродного цикла предполагала среднюю температуру поверхности от 0° до $40^\circ C$, что допускало периодические оледенения. Дефицит кислорода в атмосфере и углекислотное выветривание обеспечили почти полное высвобождение Fe^{2+} из материнских пород и его активный перенос в конечные бассейны седиментации как в растворенной, так и во взвешенной форме (силикатной и карбонатной) (Холодов и Бутузова, 2004). Таким образом, и в случае гидротермального источника, и в случае континентального выветривания первичным источником ЖКФ несомненно было закисное железо.

Считается, что ни один из минералов в ЖКФ не является первичным и наблюдаемые парагенезисы отражают как диагенетические, так и метаморфические процессы, наложенные

на первичный процесс осаждения. По всей видимости, первичными минералами железа были ферригидрит, гриналит и сидерит (Klein, 2005). Предполагаемая концентрация Fe^{2+} в архейских океанах колебалась от 0.02 до 0.5 мМ (Holland, 1973; Morris, 1993), и они содержали повышенные концентрации растворенного кремнезема, возможно даже до насыщения по отношению к аморфному кремнезему (2.20 мМ; Maliva et al., 2005). В таких условиях прямое осаждение аморфного кремнезема могло происходить непосредственно из водной толщи, или кремнезем мог вступать в реакцию с растворенным Fe^{2+} и осаждаться в виде железистых или железисто-силикатных соединений (Konhauser et al., 2007). Осаждение сидерита как первичного минерала ЖКФ, принимаемое многими исследователями (Холодов и Бутузова, 2004; Klein, 2005; Canfield et al., 2008; Jiang and Tosca, 2019), предполагает, что содержание бикарбонат иона в водах океанов в докембрии было выше современного, что обуславливалось более высоким парциальным давлением CO_2 в атмосфере (Catling and Zahnle, 2020). Таким образом, при минорном содержании сульфатов анионный состав океана в архее – протерозое был преимущественно хлоридно-бикарбонатным, а расчетные значения рН воды колеблются у разных авторов от нейтральных (Halevy and Bachan, 2017; Krissansen-Totton and Arney, 2018) до щелочных значений (Kemp and Degens, 1985).

Средняя степень окисления всех железосодержащих минералов в ЖКФ составляет $Fe^{2.4+}$ (Klein, 2005), что естественным образом ставит вопрос об эффективном способе окисления закисного железа в анаэробных условиях. Первые гипотезы, объясняющие появление окисленных соединений железа в ЖКФ, были связаны с опосредованным окислением железа за счет жизнедеятельности цианобактерий (Cloud, 1965) или с абиогенным механизмом фотозависимого окисления железа (Braterman et al., 1983). Однако оба эти механизма не объясняли структурные особенности ЖКФ (слоистость) и не соответствовали масштабам процесса. Открытие диссимиляционных железоредукторов (Балашова и Заварзин, 1980; Lovley and Phillips, 1988; Lovley et al., 1993) и процессов анаэробного фото- и нитрат-зависимого окисления железа (Widdel et al., 1993; Straub et al., 1996) позволили геологам по-новому взглянуть на возможные механизмы формирования ЖКФ. Моделирование образования ЖКФ с привлечением участия аноксигенных железooksисляющих прокариот показало, что скорости окисления закисного железа, определенные в процессе проведенных экспериментов, допускают, что такие микроорганизмы могли быть причиной образования всего окисного железа, отложившегося в первичных отложениях ЖКФ (Kappler et al., 2005). Также было показано, что, хотя скорость окисления железа исследованных штаммов аноксигенных фототрофов зависит от интенсивности света, они могут окислять закисное железо в световых режимах, соответствующих фотической зоне океана, в которой

предположительно шло накопление ЖКФ (несколько сотен метров глубины). Кроме того, окислению Fe^{2+} не препятствуют высокие концентрации растворенного кремнезема (Karpler et al., 2005). Средняя степень окисления $Fe^{2.4+}$ в ЖКФ может объяснена либо одновременным соосаждением Fe^{2+} и Fe^{3+} , либо частичным биогенным или хемогенным восстановлением осажденного Fe^{3+} в процессе диагенетических преобразований. Образование магнетита и сидерита как вторичных минералов ЖКФ возможно в процессе микробной железоредукции (Konhauser et al., 2005). Недавно была предложена модель цикла железа в океане, действующая в период архея - раннего протерозоя (Konhauser et al., 2005; Dreher et al., 2021), согласно которой до 70% биологически образованного $Fe(III)$ могло быть восстановлено в магнетит и путем ферментации и окисления органического углерода в сочетании с микробным восстановлением $Fe(III)$.

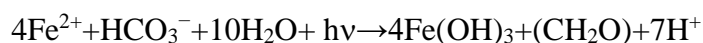
Таким образом, открытия микробных процессов, напрямую связанных с трансформацией минералов железа в анаэробных условиях позволяют рассматривать прокариот, как активных участников образования ЖКФ. В настоящее время отсутствуют условия, в которых происходило бы образование железистых кварцитов. Вместе с тем имеется ряд отдельных процессов, которые могли бы быть использованы для реконструкции возможного биогенного механизма образования этих пород.

Суммируя анализ осадочных месторождений железа, для которых рассматривается активное участие микроорганизмов в их образовании, нельзя не обратить внимание на следующие особенности. Если нанести на диаграмму устойчивости минералов железа условия образования рассмотренных месторождений (для фанерозойских достоверные, для докембрийских – предполагаемые) (Рис.2), становится очевидным, что условия образования докембрийских ЖКФ - наиболее значимых, как в планетарном так и в экономическом отношении руд железа, соответствуют метастабильному состоянию окислов, карбонатов и силикатов железа, а значит, являются наиболее благоприятными для микроорганизмов, использующих железо в качестве донора или акцептора электрона в процессах хемосинтеза в восстановительных условиях при нейтральных или щелочных значениях pH.

1.2. Прокариоты, восстанавливающие и окисляющие минералы железа в восстановительных условиях при нейтральных или щелочных значениях pH

1.2.1. Анаэробное фотозависимое окисление железа

Фотоферроавтотрофные микроорганизмы использующие световую энергию (фото-) и восстановительную силу $Fe(II)$ (-ферро-) для фиксации неорганического углерода были впервые описаны Видделем и др. (1993) и осуществляют следующую реакцию:



Аноксигенный фотосинтез с использованием Fe(II) в качестве донора электронов был впервые продемонстрирован у пурпурных бактерий, некоторые из которых были способны расти либо фотоавтотрофно, либо фотогетеротрофно (Widdel et al., 1993; Ehrenreich and

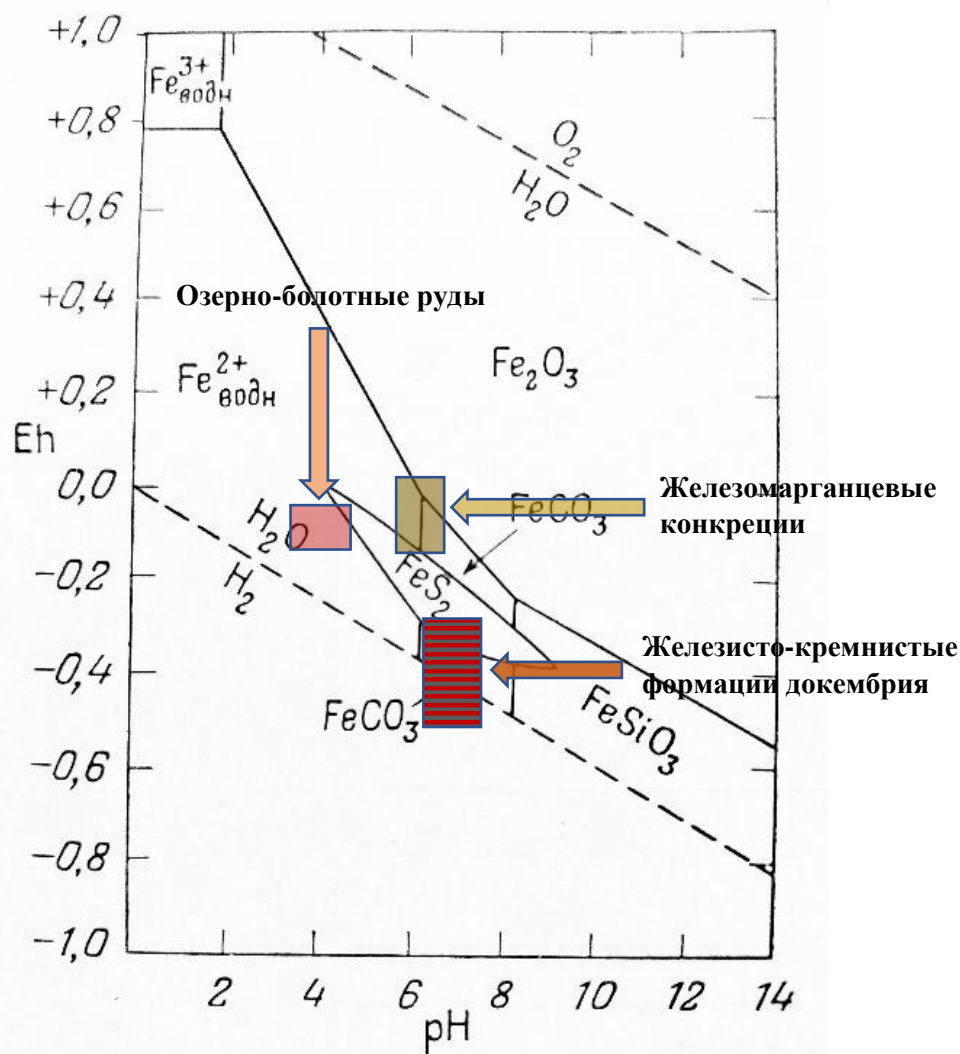


Рисунок 2. Условия (достоверные и предполагаемые) образования осадочных месторождений железа, для образования которых рассматривается участие микроорганизмов цикла железа, нанесенные на диаграмму устойчивости минералов железа в координатах Eh-pH (Гаррелс и Крайст, 1968).

Widdel, 1994). Позднее фотоферротрофия была обнаружена у бактерий различных филогенетических групп пресноводного или морского происхождения, включая представителей пурпурных серных бактерий (*Gammaproteobacteria*), пурпурных несерных бактерий (*Alphaproteobacteria*) и зеленых серных бактерий (*Chlorobi*) (Camacho et al., 2017).

Хотя большинство этих аноксигенных фототрофов способны использовать несколько типов доноров электронов, обычно встречающихся в анаэробных средах, таких как H_2S или H_2 , описаны некоторые штаммы, которые осуществляют исключительно Fe(II)-зависимый аноксигенный фотосинтез (Croal et al., 2009). К ним относятся штаммы, филогенетически родственные пурпурным серным бактериям, такие как пресноводный *Thiodictyon* sp. (Croal et al., 2004; Hegler et al., 2008) и морские виды *Rhodovulum iodolum* и *Rhodovulum robiginosum* (Straub et al., 1999; Wu et al., 2014); пресноводные пурпурные несерные бактерии, такие как *Rhodobacter ferrooxidans* sp. (Ehrenreich and Widdel, 1994; Hegler et al., 2008), *Rhodomicrobium vannielii* (Heising and Schink, 1998) и *Rhodopseudomonas palustris* (Jiao et al., 2005; Jiao and Newman, 2007); а также пресноводный вид зеленых серных бактерий - *Chlorobium ferrooxidans* (Heising et al., 1999). Описаны также бактерии, такие как пурпурная несерная бактерия *Rhodobacter capsulatus*, способные окислять Fe(II) в присутствии света, но использующая этот процесс как механизм детоксикации Fe(II) (Poulain and Newman, 2009).

Аноксигенный фотосинтез с Fe(II) в качестве донора электронов, использующий исключительно фотосистему I, был предложен как самый ранний тип фотосинтетического процесса (Raymond et al., 2003). Молекулярно-филогенетический анализ ферментов, участвующих в биосинтезе бактериохлорофилла, подтверждает существование аноксигенных фототрофов до появления оксигенных фототрофов (Xiong, 2006; Gupta, 2013). Механизмы, участвующие в окислении Fe(II) аноксигенными фототрофными Fe(II)-окисляющими бактериями, все еще недостаточно изучены. Остаются вопросы о том, как эти бактерии могут окислять различные формы Fe(II) при околонейтральных значениях pH, включая растворенный Fe^{2+} , связанный лигандами Fe(II), и минералы твердой фазы (Burgin et al., 2015), а также аспирированные электроды (Bose et al., 2014). Кроме того, неясно, как именно эти бактерии справляются с минеральными осадками твердой фазы (например, ферригидритом), которые образуются в результате окисления Fe(II).

Наиболее изученными фотоферротрофами являются пурпурные несерные бактерии (Widdel et al., 1993; Eickhoff et al., 2013; Wu et al., 2014). В частности, детально исследован механизм фототрофного окисления Fe(II) у *Rhodopseudomonas palustris* штамм TIE-1. Считается, что в этом организме перенос электронов путем окисления Fe(II) требует наличия оперона *pioABC*, где *pio* означает "phototrophic iron oxidation" (Jiao and Newman, 2007). Это трехгенный оперон, содержащий гены, кодирующие белки PioA (периплазматический десятичленный цитохром *c*-типа), PioB (бета-баррельный белок внешней мембраны) и PioC (периплазматический высокопотенциальный белок железо-серного кластера) (Jiao and Newman, 2007). PioA и PioB гомологичны MtrA и MtrB, соответственно, которые, например,

экспрессируются Fe(III)-редуктором *Shewanella oneidensis* MR-1 (Jiao и Newman, 2007). P_{io}C сходен с предполагаемой Fe(II) оксидоредуктазой Iro в *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Было показано, что удаление P_{io}A в *R. palustris* приводит к почти полной потере способности окислять Fe(II), тогда как удаление P_{io}B и P_{io}C приводит лишь к частичной потере по сравнению с диким типом (Bose and Newman, 2011). Экспрессия p_{io} генов наиболее высока при использовании Fe(II) в качестве донора электронов, но транскрибируется и транслируется при любых анаэробических условиях роста (Bose and Newman, 2011). На сегодняшний день данные о местоположении P_{io}A в клетке несколько противоречивы. С одной стороны, на основании информации о последовательности, P_{io}A считается периплазмическим белком (Jiao and Newman, 2007). Однако последующие исследования показали, что *R. palustris* TIE-1 может окислять магнетит (Burne et al., 2015) и использовать электроны непосредственно с электродов (Bose et al., 2014). Это позволяет предположить, что P_{io}A, обладающий механизмом переноса электронов и, следовательно, способностью окислять Fe(II), должен присутствовать на внешней мембране клетки. Кроме того, было показано, что *R. palustris* способен получать доступ к поверхностно связанному Fe(II) только в магнетите, что еще больше указывает на необходимость прямого механизма поверхностно-минерального контакта (Burne et al., 2016). Опероны, связанные с фототрофным окислением железа, описаны и для других пурпурных несерных бактерий, например оперон *foxEYZ* из *R. ferrooxidans* и *R. capsulatus*, также кодирует белки с аналогичными функциями, что и белки, кодируемые опероном *p_{io}* из *R. palustris* (Croal et al., 2007; Saraiva et al., 2012).

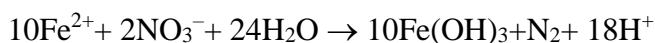
Зеленые серные бактерии являются одними из самых древних фотосинтезирующих организмов (Gupta, 2013; Gauger et al., 2016). На сегодняшний день *Chlorobium ferrooxidans* пока является единственным видом, для которого способность к анаэробному окислению железа была надежно продемонстрирована. Более того, было показано, что *C. ferrooxidans*, по-видимому, утратил большинство генов, участвующих в окислении соединений серы (Frigaard and Bryant, 2008). Neising et al. (1999) показали, что *C. ferrooxidans*, штамм KoFox был способен к фотоферроавтотрофному росту в совместной культуре с *Geospirillum* sp. штамм KoFum. Также было показано, что рост этого штамма стимулируется присутствием кремнезема, что, возможно, связано с его влиянием на химию железа, в результате чего снижается токсичность железа (Posth et al., 2010; Gauger et al., 2016). Важным преимуществом *C. ferrooxidans* по сравнению с пурпурными фотоферротрофами является способность окислять Fe(II) при очень низкой интенсивности света (<50 люкс) по сравнению с 400 люкс, необходимыми для *R. ferrooxidans* или 800 люкс для *Thiodictyon* (Hegler et al., 2008). Способность зеленых серных бактерий расти при очень слабом свете (<0.005% от

поверхностной освещенности), позволяют им развиваться в глубоких зонах аноксических богатых железом бассейнов, где доступность света достаточна только для "экономного" фотосинтеза (Manske et al, 2005).

Работы последних лет показали, что как пресноводные так и морские фотоферротрофы могут использовать электроны из твердофазных проводящих веществ (прежде всего минералов железа, таких как магнетит) для фототрофного внеклеточного поглощения электронов (pEEU), для энергетических процессов и фиксации углекислоты (Guzman et al., 2019; Gupta et al., 2019). Известно, что в морских и пресноводных осадках они сосуществуют в отложениях с железовосстанавливающими бактериями и могут обмениваться с ними электронами через магнетит (Wu et al., 2014; Вугне et al., 2015) или сульфидные минералы (Kondo et al., 2015).

1.2.2. Анаэробное нитрат-зависимое окисление железа

Этот процесс был открыт вскоре после фотозависимого окисления железа и осуществляется согласно реакции (Straub et al., 1996):



Восстановление нитрата в сочетании с окислением Fe(II) может осуществляться тремя различными способами: (1) автотрофно, при использовании Fe(II) в качестве донора электронов для получения энергии и фиксации CO₂; (2) микострофно, в этом случае нитратвосстанавливающие бактерии, окисляют Fe(II), но требуют добавления органического субстрата, такого как ацетат; (3) химически, в этом случае некоторые из описанных в литературе "хемоденитрификаторов", катализируют окисление Fe(II) в результате абиотических реакций с реактивными азотсодержащими побочными продуктами гетеротрофной денитрификации, такими как нитриты и оксид азота (Bryce et al., 2018).

Окисление Fe(II) при нитратредукции термодинамически выгодно ($\Delta G^0 = -96.23$ кДж/моль Fe), однако требует большого количества закисного железа – согласно расчетам для фиксации 1 моля углерода, требуется окислить 26 молей Fe(II) (Laufer et al., 2016). На сегодняшний день, жестким критериям автотрофного анаэробного нитратзависимого окисления железа соответствует только "культура KS", для которой показан рост клеток при наличии только Fe(II), нитрата и CO₂, подтверждено окисление Fe(II) в течение нескольких пересевов без добавления органического углерода, показано потребление CO₂ в процессе окисления Fe(II) путем включения меченого CO₂ в биомассу (Straub et al., 1996; Blöthe and Roden, 2009; Nordhoff et al., 2017). Доминирующий штамм в "культуре KS" принадлежит к семейству *Gallionellaceae*, в сообществе с видами *Rhizobium/Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*,

Comamonadaceae, *Nocardioides*, *Rhodanobacter*, *Polaromonas* и *Thiobacillus*, которые являются хемоденитрификаторами (Tominski et al., 2018). Считается, что именно представитель рода *Gallionellaceae* является автотрофным Fe(II)-окислителем. Предполагается, что автотроф фиксирует CO₂ для членов гетеротрофного сообщества, а гетеротрофные организмы детоксифицируют оксид азота, для снижения которого у автотрофа нет генетического механизма (Tominski et al., 2018).

Большинство исследований проводилось с бактериями, которые восстанавливают нитрат и окисляют Fe(II) только в присутствии дополнительного источника углерода. Некоторые исследования показали энергетическую выгоду и увеличение числа клеток при выращивании таких бактерий на ацетате и нитрате с Fe(II) по сравнению со средами без Fe(II), что можно рассматривать как свидетельство дыхания (Muehe et al., 2009; Chakraborty et al., 2011). Определение значения дыхания у потенциальных миксотрофов является технически сложной задачей. В исследовании, проведенном Jamieson с соавторами (2018) было показано, что штаммы *Acidovorax* sp. BoFeN1 и 2AN, а также *Acidovorax ebreus* strain TPSY, *Paracoccus denitrificans* Pd 1222 и *Pseudogulbenkiania* sp. штамм 2002 используют Fe(II) в процессе дыхания. Однако, авторы учитывали только внеклеточные концентрации субстратов, в то время как значительное количество реакционно активных азотистых веществ и окисление Fe(II) происходит у этих микроорганизмов в периплазме (Bryce et al., 2018). Большинство известных на сегодняшний день миксотрофных и «хемоденитрифицирующих» бактерий, осуществляющих нитрат-зависимое окисление железа, относятся к классам *Alphaproteobacteria* (*Hoeflea siderophila*, *Hoeflea marina*, *Ferrovibrio denitrificans*, *Bradyrhizobium japonicum*), *Betaproteobacteria* (*Cupriavidus necator*, *Acidovorax defluvii*, *Dechloromonas* sp., *Dechlorosoma suillum*, *Acidovorax* sp., *Acidovorax ebreus*, *Aquabacterium parvum*), *Gammaproteobacteria* (*Klebsiella oxytoca*), *Planctomycetacia* ('*Candidatus Brocadia sinica*', '*Candidatus Scalindua* sp.', '*Candidatus Kuenina*) и *Actinobacteria* (*Nocardioides* sp.) (Bryce et al., 2018).

Механизмы, используемые анаэробными бактериями для окисления Fe(II), до сих пор неясны, но, по-видимому, различаются в зависимости от того, являются ли бактерии автотрофами, миксотрофами или хемоденитрификаторами. Для автотрофных бактерий предложены три механизма окисления Fe(II), при которых либо существует оксидоредуктаза Fe(II), либо окисление происходит за счет неспецифической активности нитрат-редуктазы или комплекс bc₁ принимает электроны от Fe(II) и восстанавливает хиноны (Ilbert and Bonnefooy, 2012). Метагеномный анализ культуры KS выявил гомологи цитохрома с предполагаемой Fe(II) оксидазы Cus2 (обнаруженной в других известных железоокисляющих бактерий) в

драфтах геномов *Gallionellaceae* sp. и *Rhodanobacter* sp., присутствующих в культуре KS. Гомологи поринового комплекса цитохрома C MtoAB также были обнаружены у *Gallionellaceae* sp. в культуре KS и у *D. aromatica* RCB (который предположительно является автотрофом) (He et al., 2017). Многие исследователи предполагают, что в случае миксотрофов окисление Fe(II) происходит в результате побочной абиотической химической реакции денитрификации (Klueglein et al., 2014). Более того, допускается, что к нитрат-зависимому окислению Fe(II) могут быть способны все гетеротрофные денитрификаторы (Carlson et al., 2013). Об этом свидетельствует тот факт, что многие нитратредукторы могут окислять Fe(II), когда органические соединения предоставляется в сочетании с Fe(II) - к этой реакции способна даже *E. coli* (Brons et al., 1997). Абиотическое восстановление нитрата растворенным Fe(II) происходит медленно, но восстановление нитрита Fe(II) до N₂O кинетически благоприятно и может происходить при наличии соответствующих химических соединений, выступающих в качестве катализаторов. Например, восстановление азотных соединений Fe(II) может происходить посредством гетерогенного поверхностного катализа, при участии оксигидроксидов Fe(III), зеленой ржавчины или пирита (FeS₂), на поверхности клеток (Kampschreur et al., 2011; Bosch et al., 2012; Dhakal et al., 2013). Fe-ammoх, (Fe(III)-связанное окисление аммония) и гетеротрофное восстановление нитратов (денитрификация) могут привести к образованию промежуточных соединений азота - нитрита, NO₂ или NO, которые могут быстро реагировать с Fe(II) (Weber- et al., 2001; Picardal, 2012; Klueglein and Kappler, 2013).

Помимо растворенных форм железа Fe(II), различные виды нитратредукторов способны окислять и минеральные фазы Fe(II). Так, показано, что автотрофная накопительная культура KS может окислять Fe(II) в форме биогенного магнетита, химически осажденного сидерита, биотита (Weber et al., 2001; Shelobolina et al., 2012). Окисление биогенно восстановленного гетита, химически осажденного сидерита, биогенного магнетита и наночастиц магнетита было показано при росте хемоденитрификаторов (Chakraborty et al., 2011; Byrne et al., 2016). Сульфидные минералы, такие как пирротин (FeS), но не пирит (FeS₂) был окислен накопительной нитратвосстанавливающей культурой из морских отложений, (Schippers and Jorgensen, 2002). Вивианит окислялся культурой *Acidovorax* sp. BoFeN1 в присутствии растворенного свободного Fe²⁺ (Miot et al., 2009), а также в экспериментах с суспензией клеток *Acidovorax ebreus* (Carlson et al., 2013). Глинистые минералы, такие как иллит, смектит и нонтронит, также доступны для окисления Fe(II) *Desulfitobacterium frappieri* (Shelobolina et al., 2003) и *Pseudogulbenkiania* sp. штамм 2002 (Zhao et al., 2017). Однако культивированию микробов с минералами препятствовало окисление Fe(II), приводящее к

осаждению различных минералов Fe(III) и/или смешанных валентных минеральных фаз Fe(II)-Fe(III) на поверхности клеток, ингибируя их дальнейший рост. У многих хемоденитрификаторов осаждение происходит в периплазме, в виде оболочек, которые полностью окружают клетку, или во внеклеточных глобулах, или в виде тяжей на внеклеточном полимерном матриксе (Kappler et al., 2005; Miot et al., 2009; Schaedler et al., 2009). Инкрустация клеток ограничивает метаболические возможности этих бактерий, хотя не совсем ясно, в какой степени этот процесс является артефактом, вызванным высокими концентрациями Fe(II) в лабораторных условиях (Miot et al., 2016). Помимо гетита, минеральная инкрустация бактериальной периплазмы может состоять из вивианита, магнетита или минералов зеленой ржавчины.

1.2.3. Анаэробное восстановление железа

Восстановление железа микроорганизмами привлекло внимание ученых намного позже, чем процессы биогенного окисления. Вплоть до конца 1970-ых годов вопросы, связанные с микробным восстановлением железа развивались в основном в работах почвенных микробиологов и касались восстановления железа в почве (процесс оглеения) и илах гетеротрофными организмами (Bromfield 1954, Калакуцкий и Дуда, 1964). Была установлена последовательность использования акцепторов анаэробными микроорганизмами при затоплении почвы в соответствии с окислительно-восстановительным потенциалом соединений - быстрое исчерпание и восстановление кислорода, затем восстановление нитратов, затем марганца и железа, а за ними процессы сульфидогенеза и метаногенеза. Такая же последовательность была установлена и для морских илов, где зоны восстановления развернуты по глубине (Nealson and Myers, 1992). Для морских экосистем и в экотопах, где преобладает цикл серы большое значение в анаэробном цикле железа играет группа сульфидогенов. Их участие в восстановлении окисных минералов железа очевидно: восстанавливая соединения серы высшей валентности до сероводорода, они способствуют связыванию оксидов железа в труднорастворимые сульфиды, прежде всего, гидротроиллит – тонкодисперсный сульфид железа, при диагенезе трансформирующийся в пирротин или пирит. При этом, учитывая то, что сера связывается с двухвалентным железом, жизнедеятельность сульфидогенов не исключает процессов железоредукции, но ограничивает возможность образования железоредукторами собственной восстановленной твердой фазы.

1.2.3.1. Таксономия и экология диссимиляционных железоредукторов

Вопрос о том способны ли микроорганизмы получать энергию от восстановления железа, долго был нерешенным, пока в 1980 году не была показана возможность

восстановления железа бактерией рода *Pseudomonas*, относившейся к факультативным анаэробам, при использовании в качестве донора электронов молекулярного водорода (Балашова и Заварзин 1980). Позднее, в 1986 году на накопительных культурах была показана способность микроорганизмов восстанавливать железо органотрофно, окисляя при этом органические кислоты - ацетат, бутират, пропионат или спирты - этанол и метанол (Lovley, Phillips, 1986). *Shewanella oneidensis* (Myers and Nealson, 1988) и *Geobacter metallireducens* (Lovley et al., 1993), первые диссимиляционные марганец- и железоредуцирующие бактерии, выделенные в чистую культуру и способные к катаболическому восстановлению оксидов железа, стали модельными микроорганизмами для изучения биохимических механизмов железоредукции.

На сегодняшний день известно более 150 видов прокариот способных к диссимиляционному восстановлению железа, относящихся как к домену Bacteria, так и Archaea (Nixon et al., 2022). Подавляющее большинство из них, однако, являются бактериями и принадлежат в основном к новому классу *Desulfuromonadia*, предложенному Waite с соавторами в соответствии с проведенной ими реклассификацией Дельтапротеобактерий (2020). В этот класс входят семейства, к которым принадлежат большинство описанных диссимиляционных железоредукторов - в порядок *Desulfuromonadales* входят семейства *Desulfuromonadaceae* (*Pelobacter*, *Desulfuromonas*), *Geopsychrobacteraceae* (*Desulfuromusa*, *Geopsychrobacter*, *Malonomonas*), *Geothermobacteraceae* (*Geothermobacter*), *Trichloromonadaceae* (*Deferrimonas*); в порядок *Geobacterales* - семейство *Geobacteraceae* (*Geobacter*, *Citrifermentans*, *Geoanaerobacter*, *Geomosophilobacter*, *Geomobilimonas*, *Geomonas*, *Geotalea*, *Oryzomonas*, *Pelovirga*, *Trichlorobacter*) (Waite et al., 2020, Zhang et al., 2021; Nixon et al., 2022, Khomyakova et al., 2022a). Представители перечисленных родов доминируют в микробных сообществах в аноксических зонах и способны осуществлять восстановление железа за счет полного окисления органических соединений до CO₂ (Lovley, 2013). Помимо перечисленных родов, к диссимиляционной железоредукции при значениях pH ≥ 6.5 способны некоторые представители родов, входящих в следующие бактериальные семейства: *Aeromonadaceae* (*Aeromonas*), *Anaerosomataceae* (*Parvivirga*) *Cyclobacteriaceae* (*Fontibacter*), *Deferribacteraceae* (*Deferribacter*), *Deferrivibrionaceae* (*Deferrivibrio*), *Desulfonauticaceae* (*Desulfovolcanus*), *Enterobacteriaceae* (*Pantoea*), *Ferrimonadaceae* (*Ferrimonas*), *Holophagaceae* (*Geothrix*), *Melioribacteraceae* (*Melioribacter*), *Peptococcaceae* (*Desulfitobacterium*, *Desulfosporosinus*, *Thermincola*, *Paradesulfitobacterium*), *Rhodocyclaceae* (*Ferribacterium*), *Shewanellaceae* (*Shewanella*), *Sporomusaceae* (*Pelosinus*), *Syntrophomonadaceae* (*Carboxydocella*), *Thermoanaerobacteraceae* (*Thermoanaerobacter*, *Thermoterrabacterium*),

Thermodesulfobacteriaceae (*Geothermobacterium*), *Thermotogaceae* (*Thermotoga*), а также археи семейств *Archaeoglobaceae* (*Geoglobus*), *Thermoproteaceae* (*Pyrobaculum*), *Pyrodictiaceae* (*Pyrodictium*), *Conexivisphaeraceae* (*Conexivisphaera*), (Li et al., 2021; Nixon et al., 2022; Han et al., 2023; Khomyakova et al., 2022b; Zhang et al., 2022; Zakharyuk et al., 2023; Zavarzina et al., 2022).

Помимо диссимиляционных железоредукторов, целый ряд ферментативных бактерий, принадлежащим, например, к родам *Bacillus* и *Pseudomonas*, архей (включая метаногенов) и сульфатредуцирующих бактерий способны осуществлять неспецифичное восстановление железа. Было обнаружено, что некоторые из этих сульфатредуцирующих бактерий содержат цитохром с3 как промежуточный переносчик электронов, который используется некоторыми микроорганизмами как редуктаза железа (Lovley, 2013).

Большинство известных на сегодняшний день железоредукторов развиваются в нормальных условиях — это мезофилы, имеющие оптимум роста при нормальных температурах 25-35 °С и значениях рН 6.5-7.5. Однако, примерно 40% описанных видов железоредукторов выделено из экстремальных мест обитания – это психрофилы, термофилы, ацидофилы и алкалофилы (Nixon et al., 2022). По отношению к кислороду железоредукторы относятся как к строгим, так и к факультативным анаэробам.

Описанные на сегодняшний день железовосстанавливающие штаммы не только филогенетически разнообразны, но и выделены из разнообразных экониш, включая болота, анаэробные илы пресноводного и морского происхождения, антропогенные местообитания, включая топливные элементы, и подземные экосистемы. Наиболее распространенными среди них являются морские и пресноводные осадки, морские и наземные гидротермальные системы и почва. Несмотря на широкое разнообразие типов местообитаний, наибольшее количество штаммов железоредукторов было выделено в США (n = 37), Японии (n = 20), России (n = 14) и Германии (n = 8). Существуют обширные территории земного шара, из которых не было выделено ни одного железовосстанавливающего штамма, что является следствием субъективного отбора проб и относительно небольшого числа микробиологов, занимающихся выделением и описанием диссимиляционных железоредукторов (Nixon et al., 2022). Анализ распределения 141 вида железоредукторов в координатах рН и Т, обобщенный в работе Nixon с соавторами (2022) выявил несколько интересных закономерностей: хотя термодинамические расчеты показывают возможность существования полиэкстремофильных железоредукторов, описанные на сегодняшний день микроорганизмы либо относятся к «нормальной» микрофлоре, либо приспособлены к экстремальным параметрам роста только по одному из

исследованных параметров – рН или Т. По мнению авторов исследования, такая картина во многом является следствием предвзятости пробоотбора, и, соответственно, существенно искажает реальную картину распространенности процессов железоредукции в различных эконишах. Исправить ситуацию могло бы, с одной стороны, привлечение к анализу данных метагеномных исследований и высокпроизводительного секвенирования участков генов 16S РНК, с другой стороны, целенаправленное выделение полиэкстремофильных железоредукторов, которые могли бы разрешить вопрос о возможности существования железоредукторов в подобных условиях или выявили бы биохимические или кинетические ограничения, препятствующие развитию таких микроорганизмов.

Несмотря на то, что железоредукторы в природе в основном вынуждены восстанавливать железо из труднорастворимых минеральных форм, они успешно выигрывают конкуренцию за органические субстраты у метаногенов и сульфатредукторов. Для развития железоредукторов достаточно, чтобы парциальное давление водорода в осадках было 3×10^{-7} атм, в то время как для сульфатредукторов и метаногенов эта величина должна быть равна как минимум 2×10^{-6} и 8×10^{-6} атм соответственно (Lovley, 1987). Минимальная концентрация ацетата, необходимая для развития железо-, сульфатредукторов и метаногенов - 0.5 мМ, 2 мМ и 5 мМ, соответственно (Lovley, 1987). После работы на примере морских осадков Миддендорф (Lovley и et al., 1990), где было доказано, что железоредукторы выигрывают конкурентную борьбу за доноры электронов у сульфидогенов, а те, в свою очередь, обгоняют метаногенов, идея конкурентного исключения была широко применена для объяснения геохимической зональности для разных природных объектов (Bethke et al., 2011). Многие исследования показали, что восстановление железа обгоняет метаногенез в болотах и почвах, когда железо присутствует там в виде ферригидрита (Sahrawat, 2004), однако метаногенез доминирует в осадках озер, в которых преобладают оксиды и гидроксиды железа (Lambrecht et al., 2020; Friese et al., 2021). Работа Aromokeye et al. (2018) с инкубацией морских отложений показала, что железоредукторы не могут конкурировать с метаногенами при 10°C в присутствии гематита и магнетита. Это хорошо согласуется с термодинамическими расчетами, которые предсказывают, что восстановление ферригидрита выгоднее метаногенеза, в то время как восстановление более кристаллических оксидов железа - нет. Тем не менее, было показано, что при 4°C восстановление железа все же превосходит метаногенез (Aromokeye et al., 2018). Инкубация воды и болотных отложений с аморфными и кристаллическими оксидами железа в условиях лимитированного добавления ацетата также приводила к преобладанию железоредукции над метаногенезом (Roden and Wetzel, 2003). Эти

факторы обуславливают существенный вклад (до 50%) железоредукции в минерализацию органического вещества во многих водных экосистемах (Thamdrup, 2000).

1.2.3.2. Минералы, используемые железоредукторами

Доступность железа как потенциального акцептора электронов определяется его формой. Поскольку в зоне гипергенеза окисное железо присутствует в основном в виде оксидов и гидроксидов, почти сразу после открытия группы железоредукторов были проведены эксперименты с различными минералами железа, в процессе которых было показано, что скорость как опосредованной, так и диссимиляционной железоредукции уменьшается с ростом кристалличности минеральной фазы в ряду ферригидрит > лепидокрокит (γ -FeOOH) > гетит (α -FeOOH) > гематит (α -Fe₂O₃) (Lovley, 1987a). Большая скорость восстановления наименее упорядоченных минералов железа объясняется их большей растворимостью, развитой поверхностью и термодинамической нестабильностью. В экспериментальных работах по восстановлению природных оксидов и гидроксидов железа *Shewanella putrefaciens* и *Geobacter sulfurreducens* было доказано, что площадь поверхности минерала, а не кристаллическая структура и термодинамическая стабильность, оказывает решающее влияние как на начальную скорость бактериальной железоредукции, так и на долгосрочную степень восстановления минералов (Roden, 2006). Из этого следует, что неоднородность оксидных минералов в природных экосистемах в наибольшей степени влияет на начальные скорости бактериального восстановления, например, на ранних стадиях анаэробного метаболизма после наступления аноксических условий. Хотя термодинамические свойства оксидов могут в некоторой степени изменять скорость диссимиляционной железоредукции, этот фактор представляет собой вторичный эффект по отношению к основному контролирующему влиянию площади поверхности оксида (Roden, 2006). Известно, что кристаллические оксиды или гидроксиды железа, такие как гетит, лепидокрокит, гематит и магнетит, более распространены в почвах и верхней части литосферы, чем аморфные соединения железа, например, ферригидрит (Roden and Urrutia, 2002; Cornell and Schwertmann, 2004; Weber et al., 2006). Ферригидрит используется в качестве модельного акцептора электронов для культивирования железоредукторов из-за его легкой доступности для микроорганизмов (Lovley et al., 2004), в то время как восстановление кристаллических оксидов железа долгое время считалось весьма незначительным по масштабам процессом (Lovley and Phillips, 1988; Qu et al., 2004; Kukkadapu et al., 2006). Однако позднее было показано, что железоредукторы могут использовать самые разнообразные оксиды и гидроксиды железа в качестве акцепторов электронов (Kostka and Nealson, 1995; Kostka et al., 1996; Fredrickson et al., 1998; Kukkadapu et al., 2006). Относительно недавно было показано, что в восстановленных

горизонтах почв присутствуют железоредукторы, окисляющие ацетат за счет восстановления гетита (Hori et al., 2010; Ding et al., 2015). Hori с соавторами (2015) путем последовательных пересевов в течение 2 лет были получены устойчивые накопительные культуры на нескольких оксидах железа (гетит, лепидокроцит, гематит или магнетит), добавленных в качестве акцептора электронов. Анализ результатов высокопроизводительного секвенирования участков гена 16S рРНК показал, что полученные накопительные культуры содержали бактерий, принадлежащих к *Deltaproteobacteria* (в основном *Geobacteraceae*), *Firmicutes* и *Chloroflexi* (Hori et al., 2015).

Показано, что добавление в среду комплексообразователей, таких как антрохинон-2,6-дисульфат (AQDS), хелатов, цитратов Fe(III), и гуминовых кислот существенно увеличивает скорость железоредукции (Kappler et al., 2004b; Stern et al., 2018; Bai et al., 2020). Кроме того, неорганические соединения, например сера, также могут выступать как переносчики электронов при железоредукции (Flynn et al., 2014).

Еще одним фактором, влияющим на способность железоредукторов восстанавливать различные оксиды и гидроксиды железа, является доступность определенных доноров электронов. Например, оказалось, что бактерии из осадков эстуария р. Потомак способны были восстанавливать гематит, используя в качестве донора электронов глюкозу или водород, но не пропионат или ацетат. Если же в качестве акцептора электронов добавляли аморфную гидроокись железа, использовались все 4 предложенных донора (Lovley and Phillips, 1987). Дальнейшие исследования в этом направлении показали, что в качестве доноров электронов при железоредукции могут использоваться самые разнообразные органические (кислоты, спирты, сахара и полисахариды, амонокислоты и пептиды, углеводороды, фенолы, альдегиды, кетоны) и неорганические соединения – водород, аммоний, сера, монооксид углерода (Zavarzina et al., 2007; Kunapuli et al., 2010; Lovley, 2013; Nixon et al., 2022; Moore et al., 2023).

Помимо оксидов и гидроксидов железа, железоредукторы способны использовать трехвалентное железо, входящее в состав силикатов. Восстановление силикатов железа изучалось в основном для монтмориллонита и нонтронита, вермикулита, иллита, хлорита, иллит-сметтита и палыгорскита. Было показано, что скорость восстановления силикатов определяется, прежде всего, особенностью их кристаллической решетки, размером межслоевого пространства, размером частиц и количеством закисного железа, входящего в структуру силикатов. Чем больше двухвалентного железа содержали силикаты, тем труднее они подвергались железоредукции (Dong et al., 2009; Pentrakova et al., 2013). Микробное восстановление сметтита (Kim et al. 2004) или нонтронита (Jaisi et al., 2007, 2011) приводило к образованию иллита. Было показано, что *S. oneidensis* MR-1 способна восстанавливать до

36% исходного Fe(III) в биотите и 21% в хлорите, в результате преимущественно твердофазной реакции, так как после микробного восстановления не наблюдалось значительного растворения или изменения морфологии исходных минералов (Brookshaw et al., 2014).

1.2.3.3. Восстановленные минеральные фазы, образующиеся в процессе железоредукции

Образование магнетита как конечной восстановленной фазы при железоредукции было впервые установлено в 1987 году (Lovley and Phillips, 1987). Магнетит, образуемый железоредукторами при восстановлении ферригидрита, характеризуется в основном мелкими наноразмерными кристаллами от 10 до 50 нм в диаметре, в основном находящимся в суперпарамагнитном (<30 нм) или однодоменном (>30 нм) состоянии, причем было показано, что в результате жизнедеятельности *G. metallireducens* образуется в 5000 раз больше магнетита, чем в эквивалентной биомассе магнетотактических бактерий, в связи с этим появились сомнения по поводу генезиса однодоменного магнетита, обнаруживаемого в речных и морских осадках и почвах и идентифицируемого ранее как магнетотактический (Frankel et al., 1987; Lovley, 1990; Chistyakova et al., 2004). Образование крупных (до 50 мкм) кристаллов магнетита показано при росте термофильных железоредукторов (Слободкин и др., 1995; Zhang et al., 1998; Gavrilo et al., 2021). Помимо магнетита, характерным минералом, образующимся при железоредукции, является сидерит. Его образованию способствует увеличение парциального давления углекислоты или концентрации бикарбоната, а также недостаток ферригидрита (Lovley, 1990; Заварзина, 2004). В работе Fredrikson с соавторами (1998) было показано, что в случае добавления фосфата в среду конечным восстановленным минералом при железоредукции является вивианит. Существенная роль железоредукторов в иммобилизации фосфата была продемонстрирована на примере речных, озерных и морских осадков (Yuan et al., 2021). На образование вторичных минералов существенное влияние оказывает кинетика процесса, присутствие неорганических оксианионов, природных органических веществ. Так, было показано, что при быстром восстановлении лепидокрокита образуется преимущественно магнетит, в то время как его медленное восстановление приводит преимущественно к образованию минералов группы зеленой ржавчины (O'Loughlin et al., 2010). Результаты согласуются с концептуальной моделью, согласно которой конкурентная сорбция более прочно связанных анионов блокирует доступ бактериальных клеток и восстановленных электронозамещающих соединений к участкам на поверхности оксида железа, тем самым ограничивая скорость биовосстановления. В целом считается, что образование тех или иных минеральных фаз является в большей степени следствием физико-химических условий окружающей среды. Согласно исследованиям Zachara с соавторами

(2002) фактором, определяющим образование вторичных минералов, является скорость поступления и общая концентрация Fe^{2+} при железоредукции, а бактерии никак не влияют на этот процесс. Однако, позднее на примере трех бактериальных штаммов CN32, MR-4 и W3-18-1 рода *Shewanella* было продемонстрировано, что, несмотря на одинаковые условия инкубирования с ферригидритом в качестве конечного акцептора электронов и лактатом в качестве источника органического углерода и энергии, в экспериментах с одинаковой скоростью восстановления, но разными штаммами (CN32 и W3-18-1), образовывались разные вторичные минералы. Основным продуктом восстановления железа штаммами CN32 и MR-4 был магнетит, а для W3-18-1 - смесь магнетита и фужерита. Эти результаты позволяют предположить, что степень восстановления и соотношение образуемых вторичных минералов зависит также от вида или штамма бактерий, катализирующих восстановление железа (Salas et al., 2010).

1.2.3.4. Стратегии микробного взаимодействия с нерастворимыми соединениями Fe(III)

Слабая растворимость соединений железа при $pH > 4$ определяет стратегии, используемые диссимиляционными железоредукторами для получения энергии от восстановления трехвалентного железа, заключающиеся в различных механизмах внеклеточного переноса электронов. Поскольку клеточная стенка и внешние мембраны в случае грамотрицательных бактерий физически отделяют цитоплазматические мембраны, где обычно накапливаются электроны, от минералов железа, расстояние, которое электроны должны преодолеть от внутренней мембраны до поверхности бактериальной клетки и составляющее не менее 8 нм, слишком велико, чтобы электроны могли пересечь его с помощью механизма туннелирования. В результате, в процессе эволюции у железоредукторов появилось несколько стратегий переноса электронов, включая: (1) физический перенос электронов от цитоплазматической мембраны через клеточную стенку на поверхность минералов железа и марганца, (2) производство органических комплексообразующих лигандов, таких как сидерофоры, которые выделяются во внеклеточную среду для растворения (гидр)оксидов металлов (Weber et al., 2006), и, наконец, (3) производство низкомолекулярных редокс-активных органических молекул, которые переносят электроны между окисленными и восстановленными соединениями по принципу челнока (Hernandez and Newman, 2001).

Прямой перенос электрона при контакте клетка-минерал. Исследования, проводились в основном на двух модельных железоредукторах *Geobacter metallireducens* и *Shewanella oneidensis*, для которых была доступна полная последовательность геномов, что позволяло изучать биохимию процесса, лежащую в основе "внеклеточного дыхания"

железоредукторов. *S. oneidensis* MR-1 имеет необычайно разветвленную систему транспорта электронов, которая включает более 40 мультигемовых цитохромов с-типа, хиноны, дегидрогеназы и Fe-S белки (Shi et al., 2007). Были проведены обширные исследования по идентификации конкретных цитохромов и других биомолекул, вовлеченных в процесс переноса электронов при восстановлении Fe(III), в результате чего удалось показать, что что перенос электронов для восстановления металлов и электродов в *Shewanella* sp. происходит через группу белков, охватывающих клеточную мембрану и образующих путь Mtr (Coursolle and Gralnick, 2010). Считается, что четыре мультигемовых цитохрома CymA, MtrA, MtrC и ОмсА, а также негемовый белок MtrB образуют путь Mtr, который переносит электроны из пула менахинона на поверхность клетки (Coursolle and Gralnick, 2010). ОмсА и MtrC - цитохромы внешней мембраны, которые могут взаимодействовать непосредственно с Fe (III) или с редокс-активными флавинами, которые косвенно восстанавливают Fe (III) (Bose et al., 2009). CymA, тетрагемовый цитохром с-типа, является членом семейства NapC/NirT хиноловых дегидрогеназ, которые, как сообщается, необходимы для дыхательной универсальности бактерий. CymA рециркулирует пул QH₂ внутренней мембраны и передает электроны цитохрому MtrA внешней мембраны через многочисленные малые молекулы, такие как тетрагемовые цитохромы (STC), фумарат-редуктаза (Fcc₃) и моногемовые цитохромы scyA (Schwalb et al., 2003). Мутация в гене, кодирующем CymA, приводит к образованию штамма с дефицитом восстановления Fe (III). Дальнейшие исследования показали, что SirC, Fe-S белок, и SirD, гидрохинон-дегидрогеназа, способны функционально заменить CymA путем переноса электронов по альтернативному пути, благодаря экспрессии генов инсерционных последовательностей (Esther et al., 2015). MtrA передает электроны на ОмсА/MtrC через пориновый белок MtrB. Клетки с дефицитом MtrA не способны передавать электроны из-за нестабильности комплекса MtrABC, вызванной отсутствием цитохрома MtrA (Shi et al., 2007, Esther et al., 2015). Комплекс MtrA-MtrB-ОмсА/MtrC образует проводящий канал для переноса электронов от периплазмы к внешней поверхности. MtrB - β-стволовой белок, охватывающий внешнюю мембрану, соединяющий периплазматический MtrA и цитохром внешней мембраны MtrC, который вместе с ОмсА является конечной редуктазой дыхательного пути Mtr (Shi et al., 2007, 2012).

В геноме *G. sulfurreducens* имеется 111 предполагаемых генов для цитохромов с-типа, причем по меньшей мере 30 из них являются цитохромами внешней мембраны. При этом только четыре (ОмсВ, ОмсS, ОмсЕ, ОмсZ) из цитохромов внешней мембраны играют роль в восстановлении Fe(III). Точный путь переноса электронов из периплазмы к внешней мембране до сих пор точно не выяснен (Reguera et al., 2005), но растворимый тригемный цитохром PpcA, который на сегодняшний день является наиболее изученным белком, по-видимому, служит в

качестве промежуточного переносчика электронов. Известно, что OmcB является важным белком, участвующим в восстановлении нерастворимого Fe (III) и Fe (III) цитрата. OmcE и OmcS слабо прикреплены к внешней мембране и могут быть легко высвобождены. Предполагается, что они берут на себя роль переноса электронов непосредственно на минералы железа, подобно MtrC и OmcA из *S. oneidensis* MR-1. Было обнаружено, что OmcS выровнен вдоль пили, что позволяет переносить электроны на оксиды Fe (III) (Reguera et al., 2005). Было также высказано предположение, что белки OmcS функционируют как конденсатор, то есть могут временно хранить электроны во время перехода клеток между минералами железа (Esteve-Núñez et al., 2008). Сообщалось, что экзополисахаридный матрикс, продуцируемый *Geobacter*, богат OmcZ, октамерным цитохромом с-типа, который играет важную роль в переносе электронов, а мутанты с делецией гена OmcZ не были способны использовать твердые акцепторы электронов (Inoue et al., 2010).

Прямой перенос электронов через пили. О прямом переносе электронов через пили, сообщалось как для *Shewanella* sp, так и для представителей рода *Geobacter*. Пили — это тонкие полипептидные электропроводящие структуры, по сути являющиеся бактериальными нанопроводами (Lovely and Holmes, 2020). Msh и Pil – две основные пилиновые секреторные системы типа IV, обнаруженные у представителей рода *Shewanella*. Детальное исследование пилей *Shewanella* подтвердило, что они демонстрируют электронное поведение р-типа, сравнимое с синтетическими органическими полупроводниками (Pirbadian et al, 2014). Пили IV типа, обнаруженные у *Geobacter*, состоят из нескольких копий белков PilA. Удаление гена PilA приводило к потере роста на оксиде Fe(III) и устранению способности *Geobacter* вырабатывать ток высокой плотности (Lovely and Holmes, 2020). Продукция пилей *G. sulfurreducens* была локализована на одной стороне клетки и происходила только во время роста на оксиде Fe(III), а не на растворимом Fe(III), что подчеркивает потребность в них железоредукторов при переносе электронов на большие расстояния (около 20 мкм) во время роста на твердой фазе (Lovely and Holmes, 2020). При изучении организации пилей было показано, что электроны проскакивают через цепочку аминокислот вдоль пептидов, пока не достигнут акцептора электронов. Эта модель «прыгающих электронов» благоприятствует их переносу на большие расстояния. Исследования аминокислот PilA и их роли в восстановлении нерастворимого оксида Fe (III) показали, что карбоксильный конец PilA у *G. sulfurreducens* является областью, которая больше всего отличается от pilA других микробов и имеет пять ароматических остатков. При замене их на аланин образовывались пили с пониженной проводимостью, в результате чего мутантный штамм утрачивал способность восстанавливать нерастворимый оксид Fe (III) (Malak et al., 2004; Stefani et al., 2021).

Непрямой механизм переноса электронов. Непрямой перенос электронов осуществляется за счет редокс-активных челноков, которые переносят электроны от поверхности клетки к источнику Fe(III) (Wang et al., 2015). Эти редокс-активных челноки могут быть экзогенными, как, например, гуминовые вещества и сернистые соединения (Lovley et al., 2004), или эндогенными, как те, которые секретируются самим организмом. Было обнаружено, что *Shewanella* производит эндогенные челночные молекулы, такие как рибофлавин и рибофлавин мононуклеотид (Marsili et al., 2008). Семь генов, кодирующих белки, ответственные за биосинтез флавина, обнаружены у 23 видов *Shewanella* (Brutinel and Gralnick, 2012). Точный механизм, с помощью которого флавины пересекают внутреннюю мембрану, неизвестен. Флавины могут усиливать прямой перенос электронов (Shi et al., 2009), и оказывать влияние на окислительно-восстановительный потенциал в донных отложениях (Kappler et al., 2021). Недавно было показано, что антрахинон-2,6-дисульфоновая кислота (AQDS), модельное соединение, используемое в лабораторных экспериментах в качестве переносчика электронов, может поддерживать перенос электронов на расстояния не меньше 2 см благодаря сочетанию молекулярной диффузии и перескока электронов от восстановленных к окисленным молекулам AQDS (Bai et al., 2020). В качестве переносчика электронов может быть использован также смешанновалентный оксид железа магнетит (Liu et al., 2015).

Другой стратегией, не требующей прямого контакта клетки с нерастворимыми формами железа, является хелирование - образование комплексных соединений (хелатов), в которых железо переходит в растворимую в воде форму. Использование этого механизма в диссимиляционном восстановлении железа продемонстрировано лишь для двух бактерий: *Geothrix fermentans* и *Shewanella algae* (Liu et al., 2022).

Несмотря на значительное количество исследований, посвященных вопросам электрон-транспортных путей при железоредукции, представления об этих процессах находятся в стадии становления даже для модельных организмов. В настоящее время для предсказания микробного метаболизма в конкретных условиях в основном используется сравнительный анализ полноразмерных геномов новых микроорганизмов с функциональными генами модельных железоредукторов, поиск гомологии и попытка интерпретации полученных результатов в предсказании функций мультигеновых цитохромов. Также активно используется протеомный анализ, однако в случае железоредукторов исследователи, применяющие этот метод, сталкиваются с большими сложностями из-за работы с нерастворимыми минералами железа, затрудняющими отделение клеток и поверхностных белков от минеральных частиц, что часто приводит к получению неполноценных данных. Несмотря на то, что становится все более очевидным, что ключевыми участниками

электронтранспортной цепи диссимиляционных железоредукторов являются мультигемовые цитохромы с, неясными остаются вопросы механизма переноса электронов, а также экспрессии в периплазме «избыточных» мультигемных цитохромов с, в количестве, значительно превышающем число цитохромов, непосредственно вовлеченных в восстановление железа. Функциональный анализ мультигемовых цитохромов осложняется их исключительным разнообразием, низкой гомологией даже внутри одного рода, наличием паралогов, т.е. дубликации генов, кодирующих внешнеклеточные цитохромы, неспецифичностью мультигемовых цитохромов, расположенных на внешней мембране, что означает, что они не являются конечными железоредуктазами, а скорее служат для неспецифического стока электронов от электрон-транспортной цепи внутренней мембраны на внеклеточный акцептор (Butler et al., 2010).

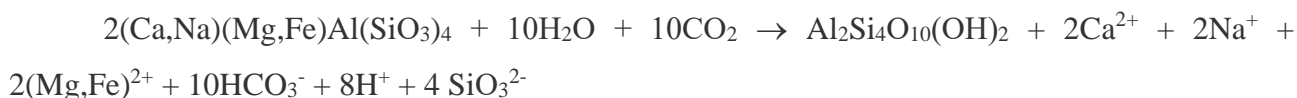
1.3. Содовые озера как естественные местообитания алкалофильных бактерий

1.3.1. Образование содовых озер

Содовые озера относятся к эпиконтинентальным водоемам аталассофильного типа, образующихся во внутриконтинентальных областях за счет атмосферного гидрологического цикла и углекислотного выветривания. Состав содовых озер зависит от мозаичных локальных условий и состава выветриваемых горных пород и поэтому весьма разнообразен (Богашова, 2007; Заварзин, 2007). Необходимым условием образования таких водоемов является отсутствие промывного режима и превышение суммы карбонатов над суммой щелочноземельных металлов. Следствием этого процесса является отсутствие в составе содовых вод катионов магния и кальция. Анионный состав представлен карбонат- и бикарбонат-ионами, составляющими буферную систему, благодаря которой рН поддерживается в щелочной области, а также хлорид- и сульфат-ионами, концентрация которых в содовых озерах может быть весьма значительной. Для образования содовых озер должны быть выполнены три гидрологических условия: (1) сток из озера в ручьи или подземные воды должен быть минимальным по сравнению с испарением; (2) при устойчивом равновесии (которое может быть никогда не достигнуто из-за динамики климата) испарение равно притоку воды; (3) приток должен быть достаточным для предотвращения полного высыхания озера (Deocampo and Renaut 2016). Доминирующие ионы в содовых озерах происходят из трех основных источников: процессов выветривания при взаимодействии воды и растворенной углекислоты с подстилающими породами, поверхностными почвами и отложениями; атмосферных осадков; в случае современных содовых озер, ассоциированных с

тектонически активными зонами (Восточно-Африканский рифт), гидротермальных флюидов и их взаимодействия с вмещающими породами (Deocampo and Renaut 2016).

Образование содовых озер в результате углекислотного выветривания происходит на основе универсальных физико-химических закономерностей взаимодействия воды и растворенных в ней газов, с минералами горных пород, представляющих собой в основном разные по составу силикаты. Химический механизм выветривания можно описать следующей реакцией:



В приведенной реакции участвует авгит – богатый железом цепочечный силикат, являющийся пороодообразующим минералом основных и средних по составу изверженных пород. В результате углекислотного выветривания образуются глинистые минералы – монтмориллонит, а катионы переходят в бикарбонат-силикатный раствор. Окисление железа может приводить к образованию силикатов и оксидов железа и образованию феррилитовых почв (Заварзин, 2007), что характерно для восточной Африки.

Содовые озера являются гидрологически замкнутыми водоемами, в которых испарение является доминирующим путем удаления воды из бассейна. Они тесно ассоциированы с тектонически активными регионами, например, с поднятиями в пределах континентальных рифтов, межгорными или вулканическими (кальдерными) бассейнами (Deocampo and Renaut 2016). Пространственное распределение содовых озер по всему миру (Рис.3) показывает, что они все без исключения связаны с современной или древней вулканической деятельностью (Pecoraino et al. 2015).

Ярким примером содовых озер, связанных с процессами континентального рифтогенеза являются озера Восточно-Африканского рифта, расположенные цепью вдоль меридионального разлома. Несмотря на то, что озера расположены в гумидном экваториальном поясе, особенности местного рельефа приводят к избыточному испарению. Озера имеют преимущественно подземное питание, хотя некоторые, например, озеро Натрон имеет речные притоки, а другие (оз. Богория и оз. Магади), расположенные в районе тектонического сброса, характеризуются активной гидротермальной деятельностью (Schagerl and Renaut, 2016). Карбонаты составляют до 80% анионов и являются причиной высоких значений $\text{pH} \geq 10.0$, характерных для этих озер, что, в свою очередь, вызывает растворение кремния, который вместе с натрием образует минерал магадиит $\text{NaSi}_7\text{O}_{13}(\text{OH})_3 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (Jones et al., 1977). Озеро Магади служит классическим примером современного процесса образования

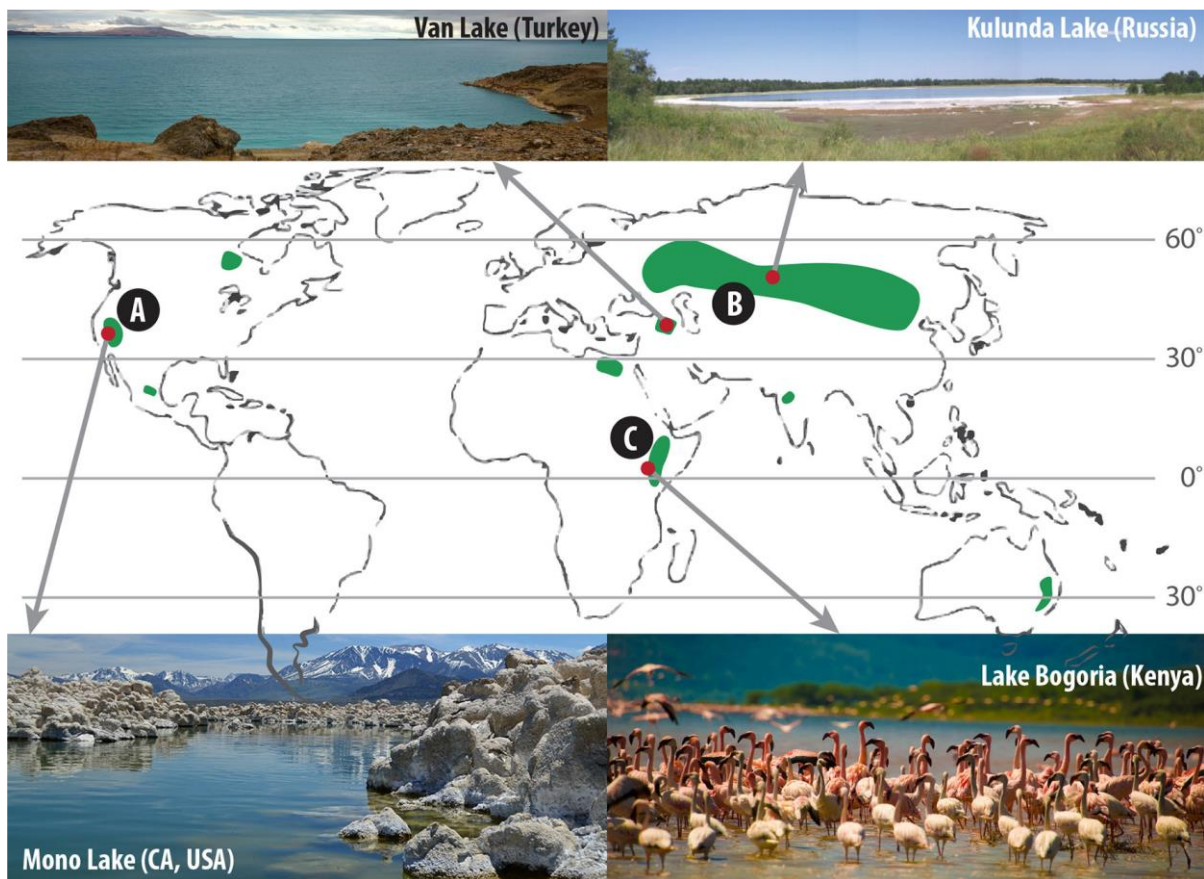


Рисунок 3. Карта мира с изображением основных районов, где встречаются содовые озера (зеленый цвет) (Sogokin et al., 2014a): (A) Северная Америка - область Калифорнии и Невады (оз. Моно), Мексиканское плато, Манитоба (Канада); (B) Евразия - озера Кулундинской степи и Монголии, плато Декан (Индия), озеро Ван (Турция); (C) Африка - содовые озера Восточно-Африканского рифта), Вади-аль-Натрун (Египет); Восточная Австралия

содовых озер. Оно расположено в самой засушливой части Кении, в нижней части рифта, в длинном узком разломе между лавовых потоков, сложенных трахеитами и карбонатитами. Озеро лишено поверхностного притока, питается подземными водами, фильтрующимися через вулканические породы основного и щелочного составов, и характеризуется переменным режимом, связанным с чередованием засушливого периода и сезона дождей. К северу от озера расположен гидротермальный водоем Малое Магади, питающийся за счет горячего подземного резервуара, находящегося на глубине 2 км (Eugster, 1980). Таким образом, оз. Магади представляет собой пример содового водоема, образовавшегося при сильном испарении в условиях аридного климата за счет выщелачивания свежих вулканических пород щелочного и основного состава разогретыми подземными водами.

Примером первичного континентального соленакопления в условиях резко континентального климата могут служить озера Алтайского края, расположенные в

Кулундинской степи и озера Центральной Азии – Монголии и Тибета. Рельеф в этих областях равнинный, со слабо развитой речной сетью, в котором блюдцеобразные понижения заняты соляными озерами, сильно различающимися по катионно-анионному составу, общей минерализации, колеблющейся в пределах 10-250 г/л, и значениям pH. В семиаридном климате озера имеют крайне неустойчивый режим, с большими межсезонными и межгодовыми колебаниями, при этом садка солей в этих озерах происходит в основном зимой за счет вымораживания (Заварзин, 2007). При понижении температуры понижается растворимость бикарбонатов и сульфатов, но не хлоридов. В результате зимой происходит садка соды и мирабилита, которые не успевают раствориться за лето. Среди озер этого обширного района подробно исследованы озера Танатары, на которых организовано содовое производство. Они представляют собой ряд озер Соленозерской степи, расположенной по правому берегу Иртыша. Помимо захороненных отложений соды, источником карбонатов для них считается химическое выветривание песков (Баталин и др., 1973).

Содовые озера представляют в геологическом масштабе времени эфемерные образования с непостоянным режимом. Растворение эвапоритов при смене климатического режима, приводит к тому, что в геологической летописи сохранились только отложения интерпретируемые как озерные осадки содовых водоемов, не содержащие соды, наиболее древним среди которых является 100-400 метровые толщи алевролитов и строматолитов позднеархейского и раннепротерозойского возраста формации Рьетгат (Rietgat) в западной части Трансвааля, Южная Африка. Они расположены в верхней части толеитовых базальтовых лавовых потоков толщиной 1600 метров и интерпретируются как глинистые осадки, накопившиеся в магматическом щелочном озере, близким современным аналогом которого может служить озеро Магади. Подтверждением этого предположения служит обнаружение в формациях минерала магадитита, образующегося только в щелочных условиях (Karpeta, 1989). Универсальность механизма углекислотного выветривания позволяет применять к этому процессу принцип актуализма. Поскольку в рассматриваемом процессе не участвует кислород, условия, необходимые для образования содовых водоемов в докембрии, были сходными с современными несмотря на то, что состав атмосферы и гидросферы был различен в разные геологические периоды (Catling and Zahnle, 2020). Более того, условия, существовавшие в докембрии, способствовали образованию содовых водоемов. К таковым следует отнести: (1) отсутствие почвы и растительности, способствующее процессам выветривания изверженных горных пород и сглаживанию рельефа (Холодов и Бутузова, 2004); (2) парциальное давление углекислоты не ниже, а, скорее, выше современного (Catling and Zahnle, 2020); атмосферный гидрологический цикл, сформировавшийся уже на ранних

этапах истории Земли (Catling and Zahnle, 2020); возможно, более высокая температура на поверхности Земли, способствующая быстрому испарению воды и концентрированию солей в бессточных областях. Таким образом, можно полагать, что в разные геологические периоды, начиная с конца архея - раннего протерозоя, существовали содовые водоемы, аналогичные современным. Масштаб их образования мог быть различным, но, по всей вероятности, в докембрии эти водоемы занимали большие площади по сравнению с их современными аналогами. Модель «содового океана», существовавшего в архее-протерозое, в момент образования ЖКФ, предложенная С. Кемпе, основана на предположении о том, что в условиях углекислотной атмосферы и высокого геотермического градиента процессы углекислотного выветривания были настолько интенсивными, что это приводило к масштабному формированию щелочных карбонатных вод, способствующих миграции кремния и силикатов железа (Kempe and Degens, 1985). Эта теория не встретила поддержки прежде всего из-за того, что рН океанической воды должен был быть достаточно кислым, чтобы удерживать в растворе закисное железо (см. раздел 1.1.4.3). Кроме того, для взаимодействия атмосферы с породами необходимы субаэральные, а не субаквальные условия. Гипотеза «содового континента», предложенная Г.А. Заварзиным (1993), учитывала соображения, высказанные С. Кемпе, но в приложении к субаэральной поверхности суши. Основным вопросом, рассматриваемым в рамках этой гипотезы, было в какой мере углекислотное выветривание силикатов в архее-раннем протерозое определяло щелочные условия на поверхности суши и какое значение оно могло иметь для микробиоты?

Гипотеза «содового континента» послужила основанием для многолетней разработки этой проблемы сотрудниками ИНМИ им. С.Н. Виноградского, результаты которой были обобщены в коллективном труде «Алкалофильные микробные сообщества» (Труды ИНМИ, 2007). Основное внимание было уделено микробным процессам, протекающим в анаэробных осадках содовых озер, как возможным аналогам тех, что развивались в бескислородной атмосфере архея-раннем протерозоя.

1.3.2. Анаэробные микробные сообщества содовых озер

Микробиота содовых озер представлена алкалофилами и галоалкалофилами, развивающимися в условиях избытка натрия и повышенных значений рН, обусловленных карбонат-бикарбонатной буферной системой и зачастую высокой температурой и минерализацией вод. Таким образом, микроорганизмы находятся под воздействием сразу нескольких экстремальных факторов, таких как высокие значения рН, повышенное осмотическое давление, вызванное высокой концентрацией солей в среде, сильными колебаниями температуры и крайне неустойчивым гидрологическим режимом (Mesbah and

Wiegel, 2008). Для подавляющего большинства эукариот такие места обитания непригодны для жизни, что обеспечивает ведущую роль прокариот в биоценозах содовых озер. Алкалофильные прокариоты, развивающиеся в таких условиях, обладают рядом адаптивных особенностей, к которым следует отнести: (1) механизм поддержания внутриклеточного pH с помощью натриевого антипорта (Пушева, 2007); (2) высокоэффективную систему транспорта металлов, присутствующих в содовых озерах в низких концентрациях; (3) уникальный состав мембранных липидов (наличие фосфолипидов, а не гликолипидов) (Tindall, 1988); (4) более кислый аминокислотный состав белков (Деткова, 2007); (5) повышенную термоустойчивость и устойчивость к высушиванию (Mesbah and Wiegel, 2008); (6) механизм осмоадаптации реализованный либо в накоплении органических осморегуляторов, имеющих высоких осмотический потенциал, таких как глутамат, бетаин (стратегия наиболее действенна в низкоминерализованных содовых озерах), либо в стратегии «соль внутри», свойственной археям порядка *Halobacterales* и бактериям порядка *Halanaerobiales*, когда внутри клетки поддерживается высокая концентрация солей ионов Na^+ , K^+ и Cl^- (Gunde-Cimerman et al., 2018).

Автономность прокариотного сообщества подразумевает замкнутость по циклу углерода, т.е. наличие всех трофических групп, обеспечивающих круговорот органического углерода. Содовые озера характеризуются высокой продуктивностью, определяемой, прежде всего высокой инсоляцией и доступностью фосфата, поступающего из выветриваемых пород и долго сохраняющегося в рецикле, что обусловлено малыми концентрациями Ca и Fe, которые связывают фосфат-ион (Sorokin et al., 2014). Уровень первичной продукции содовых озер превышает 10 г С м^{-2} в сутки, в то время как средняя первичная продуктивность пресных озер составляет около 0.6 г С м^{-2} в сутки; таким образом, содовые озера являются самыми продуктивными водными экосистемами мира (Grant and Jones, 2016). Повышенная продуктивность, обуславливающая евтрофикацию содовых озер, приводит к быстрому образованию анаэробной зоны, как из-за понижения растворимости кислорода и ограничения транспорта, связанного с повышенной плотностью среды, так и из-за усиленного потребления O_2 алкалофильными аэробами. Сообщество деструкторов имеет сложную высокоэффективную структуру, служащую противовесом, уравнивающим активную жизнедеятельность продуцентов и не допускающим избыточного накопления органического углерода.

1.3.2.1. Продуценты алкалофильных микробных сообществ

Основными продуцентами алкалофильных сообществ являются планктонные и бентосные цианобактерии (Герасименко, 2007, Самылина и др., 2010, 2015). На свету цианобактерии фотосинтезируют, продуцируя кислород, в то время как в темноте переходят к анаэробному обмену. Существенные суточные колебания содержания кислорода в водном и придонном слоях содовых озер способствуют развитию факультативных анаэробов, – микроорганизмов, идеально приспособленных для подобных условий. Помимо цианобактерий, к продуцентам в алкалофильном сообществе следует отнести также аноксигенных фототрофных бактерий, которые представляют значимую группу в содовых озерах (Горленко, 2007; Горленко и др., 2020). Основная функция аноксигенных фототрофов в современном сообществе содовых озер заключается в регенерации окисленных соединений цикла серы в процессе светозависимого окисления сульфида, образуемого сульфидогенами, сопряженного с возвратом органического вещества в малый анаэробный круговорот органического углерода. Следует также отметить, что в ряде случаев аноксигенный фотосинтез может играть определяющую роль в продукции органического вещества, как это наблюдается в озере Хилганта (Юго-Восточное Забайкалье), где доля кислородного фотосинтеза составляет только 3-4% (Горленко, 2007). Фототрофные бактерии также участвуют в утилизации молекулярного водорода и органических соединений, образуемых первичными и вторичными деструкторами. В содовых озерах найдены все известные филогенетические группы аноксигенных фототрофов, за исключением зеленых серобактерий класса *Chlorobi*. Доминируют же в алкалофильных сообществах представители семейства *Ectothiorodospiraceae*, большинство видов которого являются алкалофилами (Kompantseva et al., 2007). Органическое вещество, поступающее в анаэробную зону, подвергается полной минерализации вследствие каскада реакций, осуществляемых микробами-специалистами.

1.3.2.2. Анаэробное разложение органического вещества

В восстановленных осадках содовых озер облигатные анаэробы являются "вторичными органотрофами", использующими продукты первичного гидролиза, обеспечиваемого аэробами и факультативными анаэробами. Анаэробные бродильщики состоят из двух подгрупп - тех, которые разлагают полимеры, и вторичных гетеротрофов, которые утилизируют полученные мономеры. Разложение целлюлозы, представляющей собой основной компонент мортмассы зеленых водорослей и бактерий, осуществляется гидролитической группы целлюлозолитиков, первым алкалофильным представителем которых выделенным в чистую культуру, является *Clostridium alkalicellulosi* – споровый

галоалкалофил, сбраживающий целлюлозу до этанола, лактата, ацетата и водорода (Жилина и др., 2005) и обладающей щелочной целлюлазой, имеющей оптимум активности при pH 6-9 (Zvereva et al., 2006). Кроме целлюлозолитиков известны алкалофильные анаэробные бактерии, разлагающие крахмал, пектин, ксилан, хитин (Sorokin et al., 2015, Grant and Jones, 2016). Разложение белков осуществляют анаэробы-протеолитики, галоалкалофильным представителем которых являются бактерии рода *Proteinivorax*, выделенные из самосадочных содовых озер Танатары (Kevbrin et al., 2013).

Второй этап разложения целлюлозы в анаэробном алкалофильном сообществе осуществляет группа сахаролитических бактерий, специализирующаяся на сбраживание ди- и моносахаридов. Среди представителей этой группы, выделенных из содовых озер преобладают галоалкалофильные *Firmicutes*, относящиеся к родам *Anoxynatronum*, *Anaerovirgula*, *Alkaliphilus*, *Natranaerobius* и *Natranaerobaculum* и некоторые виды *Anaerobranca*, *Spirochaeta* и *Anaerobacillus* (Grant and Jones, 2016). В этой группе можно выделить подгруппу диссипотрофов – организмов, использующих низкомолекулярные продукты гидролиза в низких концентрациях, классическим примером которых являются спирохеты, обнаруженные как в высокоминерализованных озерах Африканского рифта и Калифорнии, так и в низкоминерализованных озерах Центральной Азии (Zhilina et al., 1996; Hoover et al., 2003). Все они имеют яркую морфологию, являющуюся следствием их пищевой стратегии – большая поверхность клетки позволяет соприкоснуться с большим объемом раствора, улавливая необходимые субстраты даже в низких концентрациях. Основными продуктами обмена спирохет являются ацетат, лактат, этанол и у некоторых видов водород. Активное потребление пептидов осуществляется в анаэробном сообществе также и хемоорганотрофами-бродильщиками, которые помимо анаэробного брожения способны использовать неорганические акцепторы электронов, которые в основном привлекаются для сброса избыточных электронов в процессе, так называемого облегченного брожения. В процессе последовательного разложения органического вещества происходит образование ацетата и водорода – восстановленных продуктов, окисление которых требует привлечения элементов с переменной валентностью. Этот последний, заключительный этап разложения органического вещества, осуществляется вторичными хемоорганотрофными или хемолитотрофными анаэробами, метаболизм которых основан на окислительно-восстановительных реакциях хемосинтеза.

По термодинамическим причинам полное разложение органического вещества в анаэробных условиях зависит от удаления водорода, накапливающегося на первом, водородном или кислотогенном, этапе деструкции (Schink, 2002, Schink and Stamps, 2002). В

анаэробном алкалофильном сообществе традиционно выделяют три основных группы литотрофных и хемоорганотрофных микроорганизмов, использующих водород и ацетат в метаболических реакциях – это группы метаногенов, ацетогенов и сульфидогенов. Сравнительное исследование развития этих групп, проведенное в смешанной пробе из 9 содовых озер Тувы, показало, что основной сток H_2 в содовых озерах осуществляется за счет развития серо- и сульфатредукторов, поскольку H_2 -использующих метаногенов обнаружено не было, а ацетогены развивались в условиях $pH > 8$ и низкой солености (Заварзин и др., 1996). Высокие значения pH , характерные для содовых озер, вызывают ряд химических изменений важных для микробного круговорота серы. Во-первых, сульфид присутствует полностью в ионной форме в виде HS^- , которая, в отличие от H_2S , не может свободно пересекать мембрану и поэтому не является токсичной. Вследствие этого алкалофильные сульфидогены могут переносить гораздо более высокие концентрации сульфида, накапливающегося в процессе их жизнедеятельности, чем нейтрофилы. Кроме того, сульфид может вступать в химическую реакцию с нерастворимой серой, образуя растворимые полисульфиды, которые стабильны при высоком pH . В аэробных условиях полисульфид быстро окисляется до тиосульфата, в то время как в анаэробных условиях он накапливается в высоких концентрациях, представляя собой истинный субстрат для сероредукторов (Sorokin et al., 2011). Нахождение серы в доступной растворенной форме в щелочных условиях дает преимущество сероредукторам, что нашло отражение в результатах, полученных по озерам системы Танатар.

Обычно донные осадки содовых озер имеют темный цвет с характерным запахом сероводорода, что указывает на активный сульфидогенез. Ограниченное количество прямых *in situ* измерений скорости восстановления сульфатов с помощью $^{35}SO_4^{2-}$ (Горленко и др., 1999; Sorokin et al., 2004; Kulp et al., 2006) и потенциала восстановления сульфатов в донных осадках (Kulp et al., 2007) выявили активную популяцию сульфатредуцирующих бактерий в различных содовых озерах, восстанавливающих сульфат со скоростью, сравнимой с той, которая наблюдается в прибрежных морских лагунах. Более детальные исследования, проведенные Д.Ю. Соркиным для содовых озер Кулундинской степи подтвердили активное восстановление сульфатов, но также показали, что наиболее активный сульфидогенез был обусловлен деятельностью сероредукторов, которым уступали тиосульфатредукторы, в то время как сульфатредукторы были наименее активны (Sorokin et al., 2010c). Сульфидогенез стимулировался добавлением различных доноров электронов, из которых формиат был наиболее эффективным. Водород не приводил к увеличению образования сульфида ни с одним из соединений серы, в то время как добавление ацетата стимулировало сероредукцию (Sorokin et al., 2011).

Молекулярный анализ на основе гена 16S рРНК микробных сообществ различных содовых озер лишь в редких случаях обнаруживал известные флотипы сульфатредукторов, принадлежащих к *Deltaproteobacteria*. В частности, последовательности, относящиеся к ранее описанному роду *Desulfonatronum*, были обнаружены в озере Моно (Scholten et al., 2005), озерах Вади Натрун (Mesbah et al., 2007) и в Кулундинской степных озерах (Foti et al., 2008). Более узконаправленный анализ с использованием функционального маркера *dsrAB*, кодирующего сульфитредуктазу, важный фермент в пути восстановления сульфата, показал присутствие флотипов сульфатредукторов, принадлежащих к порядкам *Desulfovibrionales* и *Desulfobacterales* в содовых озерах Сибири (Foti et al., 2007). В порядке *Desulfovibrionales* последовательности были близки к родам *Desulfonatronum* и *Desulfonatronovibrio*, в то время как обнаружение клонов *dsrAB* в порядке *Desulfobacterales* указывало на присутствие еще неизвестных гетеротрофных сульфатредукторов в исследованных содовых озерах. Из содовых озер с разной минерализацией выделен целый ряд гидрогенотрофных сульфидогенов, представляющих новые роды в *Deltaproteobacteria* - *Desulfonatronovibrio* (Zhilina et al., 1997); *Desulfonatronum* (Пикута и др., 1998); *Desulfonatronospira*, *Desulfurivibrio*, *Dethiobacter* (Sorokin et al., 2008a,b), Они способны к восстановлению соединений серы за счет окисления водорода, формиата, а также целого ряда органических кислот, за исключением ацетата и спиртов. *Desulfurivibrio alkaliphilus* (Sorokin et al., 2008b) – первый алкалофильный сульфидоген, способный использовать ацетат в качестве донора электронов с тиосульфатом или элементарной серу/полисульфид в качестве акцептора. Избыток сероводорода, который не связывается железом, окисляется в содовых озерах до сульфата сероокисляющими бактериями или аноксигенными фототрофами, большое количество новых таксонов которых описано Д.Ю. Соркиным и В.М. Горленко (Sorokin et al., 2015, Горленко 2007) и поступает в рецикл. Таким образом, в содовых озерах водород активно используется различными сульфидогенами, в то время как использование ацетата сульфатредукторами затруднено и осуществляется в основном серо- и тиосульфатредукторами. Альтернативой сульфидогенному окислению ацетата служит его синтрофное окисление. При синтрофном взаимодействии действует пара микроорганизмов, в которой один окисляет ацетат или другую несбраживаемую органическую кислоту или спирт с выделением H_2 , а второй – гидрогенотрофный организм - немедленно удаляет из системы водород, что делает реакцию окисления ацетата термодинамически выгодной (Schink, 2002, Schink and Stamps, 2002). На сегодняшний день описаны две алкалофильные ацетат-окисляющие синтрофные ассоциации, выделенные из содовых озер (Жилина и др., 2005; Sorokin et al., 2014b), и в обеих идентифицированы бактерии семейства *Syntrophomonadaceae*. *Candidatus "Contubernalis alkalaceticum"* окисляет ацетат, этанол и некоторые другие органические соединения в совместных культурах с

галоалкалифильными гидрогенотрофными сульфатредуцирующими бактериями рода *Desulfonatronum* (Жилина и др., 2005), а *Candidatus "Syntrophonatronum acetioxidans"* окисляет только ацетат в ассоциации с гидрогенотрофным партнером из рода *Desulfonatronospira* (Sorokin et al., 2014b). Обе бактерии являются облигатными синтрофами, и все попытки выделить их в чистых культурах были безуспешными. В 2016 году Д.Ю. Сорокин с соавторами описали три новых рода облигатных синтрофов порядка *Syntrophomonadales*, способных окислять прямоцепочечные жирные кислоты в ассоциации с щелочными метаногенами рода *Methanocalculus* или щелочными сульфатредукторами. Также была описана метаногенная ассоциация, содержащая облигатные синтрофные бактерии, тесно связанные с *C. "C. alkalaceticum"* (99% сходства последовательности гена 16S рПНК) (Sorokin et al., 2016). Таким образом, было показано, что этот микроорганизм может участвовать в синтрофной ассоциации с различными партнерами, утилизирующими водород (Sorokin et al., 2016).

Метаногенез и ацетогенез играют явно подчиненную роль в заключительных этапах разложения органического вещества в анаэробных осадках современных содовых озер. Обнаружение метана в относительно высоких концентрациях в содовых озерах Северной Америки и Центральной Азии и прямые измерения метаногенной активности показали, что этот низкоэнергетический терминальный анаэробный процесс активен в них с доминированием метилотрофного пути, аналогичного тому, который обнаруживается в соленых озерах с нейтральными значениями pH (Oremland and Miller, 1993; Sorokin et al., 2015). Обнаруженные метилотрофные археи (и их клоны гена *mcrA*) принадлежали к родам *Methanlobus* (при умеренной солености) и *Methanosalsum* (при высокой солености) (Mathrani et al., 1988; Oremland and Boone, 1994; Sorokin et al., 2015b). Однако измерения активности в отложениях содовых озер, молекулярный анализ гена *mcrA* и усилия по культивированию показали, что группа литотрофных галоалкалифильных метаногенов может производить метан и расти с H_2 и формиатом при pH выше 9 в содовых рассолах вплоть до насыщения ($4 M Na^+$) (Sorokin et al., 2015b). Первая литотрофная галоалкалофильная архея *Methanocalculus natronophilus* была выделена из донных отложений озера Танатары (Жилина и др., 2013) Более того, в отложениях содовых озер и накопительных культурах была показана возможность ацетокластического метаногенеза (Sorokin et al., 2015a). Первые литотрофные ацетогены были выделены Т.Н. Жилиной из содовых озер Танатар и описаны как два вида нового рода *Fuchsiella* (Zhilina et al., 2012, 2015).

Следует отметить, что, помимо перечисленных трех групп вторичных анаэробов, в алкалофильных сообществах озер с разной гидрохимией развиваются бактерии, использующие соединения таких элементов как мышьяк, селен, молибден, уран и других

переменновалентных элементов. Они привлекли особое внимание в связи с мышьяковыми геохимическими провинциями в дождевой тени Кордильер. Предполагается, что такие сообщества могли иметь значение на ранних этапах развития биосферы Земли (Stolz, 2010).

Все вышеизложенные этапы разложения органического вещества суммированы в схеме, представленной на рисунке 4. Схема не является исчерпывающей в таксономическом отношении и микроорганизмы, указанные в ней, являются только примером той или иной физиологической группировки. Обращает на себя внимание то, что на стадии образования-потребления органических кислот, спиртов, ацетата, формиата и водорода существует сеть трофических взаимодействий. Это указывает на то, что полное разложение сложных органических соединений, таких как целлюлоза, может идти и более коротким маршрутом, минуя сахаролитический этап, что было доказано в комбинированных культурах алалофильных анаэробов (Заварзин и др., 2008).

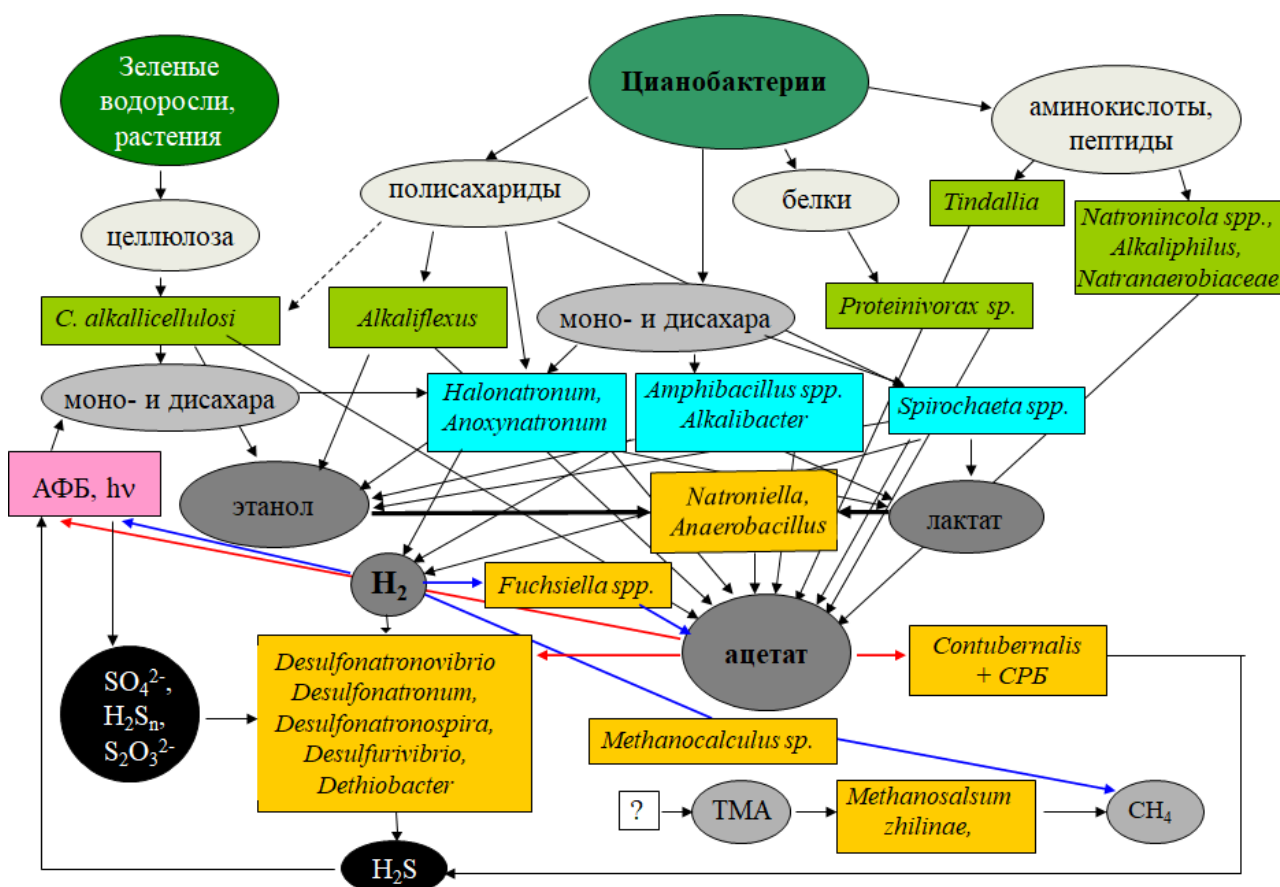


Рисунок 4. Схема трофических взаимодействий в анаэробном микробном сообществе содовых озер, осуществляющем разложение органического вещества (Заварзина, 2013).

Таким образом, имеющиеся на сегодняшний день сведения о функционировании анаэробного алкалофильного сообщества современных содовых озер достаточны для того, чтобы использовать его в качестве актуалистической модели наземной биоты докембрия. Однако возникает вопрос: какая группа вторичных анаэробов могла взять на себя функцию удаления водорода и ацетата в анаэробном сообществе содовых озер докембрия в условиях редуцированного цикла серы в отсутствии сульфатов и дефицита кислорода и избытка железа? Очевидно, что при доминировании цикла железа и более чем вероятном существовании обширных эпиконтинентальных содовых водоемов в докембрии, эту функцию могли осуществлять алкалофильные диссимиляционные железоредукторы. Однако на момент начала наших исследований сведения о возможности осуществления этого процесса практически отсутствовали.

1.3.2.3. Восстановление железа алкалофильными бактериями

Возможность восстановления железа алкалофильными бактериями была впервые показана на примере *Tindallia magadiensis* (Kevbrin et al., 1998). Эта облигатно анаэробная бактерия, оптимально растущая при pH 8.5, была выделена из донных отложений озера Магади. *T. magadiensis* развивалась за счет сбраживания ограниченного числа аминокислот, преимущественно аргинина и орнитина, с образованием ацетата пропионата и аммиака, а также пептона, пирувата, цитрата и 2,3-бутандиола. Были проведены эксперименты как с синтезированным ферригидритом, так и с природным, собранным из болотных отложений ручья Яснушка (Абрамцево, Московская обл.). В качестве доноров электронов использовали пептон, пируват, цитрат и 2,3-бутандиол. В результате роста бактерии около 15% окисного железа было восстановлено в закисное (Kevbrin et al., 1998).

В это же время вышла статья с описанием двух новых видов бацилл, выделенных из анаэробного или содового озера Моно (Калифорния, США), характеризующегося повышенным содержанием мышьяка (Switzer Blum et al., 1998). Оба вида росли за счет диссимиляционного восстановления As(V) до As(III) с одновременным окислением лактата до ацетата и CO₂. *Bacillus arsenicoselenatis* также осуществляла диссимиляционное восстановление Se(VI) до Se(IV), а *Bacillus selenitireducens* восстанавливала Se(IV) до Se(0). Оба вида являлись облигатными алкалофилами с оптимумом роста в диапазоне pH 8.5-10.0. Эксперименты с отмытой клеточной биомассой обоих видов, выращенных на селенате (*B. arsenicoselenatis*) и селените (*B. selenitireducens*) выявили способность бактерий окислять лактат в присутствии Fe(III)-NTA. У *B. arsenicoselenatis* также была выявлена способность к слабому росту на лактате с Fe(III)-NTA (Switzer Blum et al., 1998).

В 2004 году вышло описание новой облигатно анаэробной, алкалотермофильной, хемоорганотрофной бактерии *Anaerobranca californiensis* выделенной В.М. Горленко из осадков щелочного горячего источника, расположенного на острове Паоха озера Моно (Калифорния, США). Эта бактерия сбрасывала пептон, казаминовые кислоты и дрожжевой экстракт, но была способна к хемоорганотрофному росту, за счет восстановления серы, полисульфида или тиосульфата. Также бактерия восстанавливала Fe(III)-цитрат и синтезированный ферригидрит, с образованием магнитного осадка (Gorlenko et al., 2004).

Железоредактирующие накопительные культуры были получены из очистительных щелочных прудов предприятия U.S. Borax Company (Калифорния, США). В результате в чистую культуру была выделена бактерия, описанная как новый вид «*Alkaliphilus metalliredigens*» (Ye et al., 2004) до сих пор не валидированный. Эта анаэробная бактерия была способна расти с Fe(III)-цитратом, Fe(III)-ЭДТА, Co(III)-ЭДТА или Cr(VI) в качестве акцепторов электронов, а дрожжевой экстракт и лактат служили донорами электронов. Восстановление железа происходило в диапазоне pH от 7.5 до 11.0 с оптимумом при pH 9.5, NaCl от 0 до 80 г/л (оптимально при 20 г/л) и температуры от 4 до 45 °C (оптимально, при 35 °C); при этом образовывались восстановленные соединения железа. Бактерия была неспособна к брожению и не росла с дрожжевым экстрактом, лактатом или сочетанием этих субстратов в отсутствие акцепторов электронов. При этом она не была способна к восстановлению акагенита β -FeO(OH) или пиролюзита MnO₂. На основании полученных результатов авторы ставили под сомнение способность бактерий восстанавливать нерастворимые формы железа при pH выше 9.0 (Ye et al., 2004).

На сегодняшний день помимо вышеперечисленных и описанных в данной работе таксонов, выделено еще лишь несколько алкалофильных железоредактирующих бактерий: *Tindallia texcoconensis* (Alazard et al., 2007), *Salimesophilobacter vulgaris* (Zhang et al., 2013), *Geosporobacter ferrireducens* (Hong et al., 2015), *Alkaliphilus namsaraevii* (Zakharyuk et al., 2017), *Wukongibacter baidiensis* (Li et al., 2017), «*Geoalkalibacter halelectricus*» (Yadav et al., 2022). Алкалофильные железоредактирующие археи неизвестны.

Таким образом, к началу наших исследований сведения, касающиеся процессов анаэробной трансформации минералов железа в щелочных анаэробных условиях, были крайне ограничены. Отсутствие сведений о возможности использования водорода и ацетата в качестве доноров электронов при алкалофильной железоредукции ставило под сомнение вопрос завершающего этапа разложения органического вещества в отсутствие сульфидогенов. Процесс анаэробного окисления железа в щелочных условиях был не изучен.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Природные образцы

В работе были использованы образцы осадков и воды из содовых озер и наземных термальных источников, отобранные в ходе экспедиций, проводимых лабораториями реликтовых микробных сообществ и гипертермофильных микробных сообществ ИНМИ РАН (оз. Магади (Кения), 1991-1992 гг.; содовые озера Забайкалья, 1996 г.; оз. Хадын (республика Тыва), 1997 г.; содовые озера Танатары (Алтайский край) 2007-2008 гг., источник Солнечный (кальдера Узон, Камчатка) 2015 г.) автором и соавторами совместных публикаций (Таблица 1).

Таблица 1. Характеристики природных образцов, использованных для получения накопительных культур алкалофильных и термофильных анаэробных прокариот

описание пробы	pH	минерализация, г/л	T, °C	место отбора
восстановленный черный осадок+вода	9.5	17	23	содовое озеро Хадын (Республика Тыва, Россия)
восстановленный черный осадок+вода	10.2	24.0	25	содовое озеро Верхнее Белое (Бурятия, Россия)
восстановленный черный осадок+вода	10.35	108	25	содового озера Танатар III (Алтай, Россия)
восстановленный черный осадок+вода	9.5	170	35	содовое озеро Магади (Кения, Африка)
рыжий осадок на глубине 10 см ниже поверхности + вода	6.1	нд	52	термальный источник Солнечный (кальдера Узон, Камчатка)

Образцы природных минералов были любезно предоставлены д.г.-м.н. А.Ю. Бычковым (Геологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова), д.г.-м.н. В.С. Савенко (Географический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) и д.г.-м.н. Т.В. Алексеевой (Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пущино) (Таблица 2). Отобранные кристаллы минералов измельчали в порошок в агатовой ступке. Чистоту минералов проверяли методами рентгенофазной и Мёссбауэровской спектроскопии.

Таблица 2. Железосодержащие фазы, использованные в экспериментах.

минерал	химический состав	происхождение	месторождение
сидерит	FeCO_3	гидротермально-метасоматическое	Бакальского месторождение (Урал, Россия)
сидерит	FeCO_3	осадочное	Морские конкреции (Воронежское нагорье, Павловск, Россия)
глауконит	$\text{K}_{0.8}(\text{Mg}_{0.4}\text{Fe}^{2+}_{0.1})(\text{Fe}^{3+}_{1.1}\text{Al}_{0.4})[(\text{Si}_{3.7}\text{Al}_{0.3})\text{O}_{10}](\text{OH})_2$	осадочное	Маарду (Эстония)
биотит	$(\text{K}_{0.89}\text{Na}_{0.03})(\text{Mg}_{0.9}\text{Fe}^{2+}_{1.1}\text{Al}_{0.43}\text{Fe}^{3+}_{0.22}\text{Ti}_{0.09}\text{Mn}_{0.03})[\text{Al}_{1.26}\text{Si}_{2.8}\text{O}_{10}](\text{OH},\text{F})_2$	метаморфическое	Карелия (Россия)
«континентальная кора»	кварц (SiO_2), 30%; роговая обманка ($\text{Ca}_2(\text{Mg},\text{Fe},\text{Al})_5(\text{Al},\text{Si})_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$), 7%; мусковит $\text{KA}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{OH})_2$, 8%; биотит $(\text{K}(\text{Mg},\text{Fe})_3[\text{Si}_3\text{AlO}_{10}][\text{OH},\text{F}]_2)$, 8%; микроклин $(\text{K}[\text{AlSi}_3\text{O}_8])$ 10%; альбит $(\text{Na}[\text{AlSi}_3\text{O}_8])$, 20%; лабрадор $(\text{NaAlSi}_3\text{O}_8 + n \text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8)$, 20%.	искусственная смесь	
стальная проволока	$\text{Fe}_{0.98}\text{Mn}_{0.02}$	<i>Emil Lux GmbH and Co. KG, Германия</i>	

2.2. Состав сред и условия культивирования

Все среды готовили анаэробно с применением модифицированной техники Хангейта (Жилина и Заварзин, 1978; Ljungdahl and Wiegel, 1986) под N_2 (100% в газовой фазе), CO_2 (100% в газовой фазе) или смеси N_2/CO_2 (80/20% в газовой фазе). Как правило, среды не содержали восстанавливающих агентов, но в некоторых случаях в качестве восстановителя использовали $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ в концентрации 0.1-0.5 г/л. Для получения и культивирования накопительных и чистых культур алкалофильных и термофильных микроорганизмов были использованы несколько сред разного минерального состава.

Низкоминерализованная среда Хадын (среда Хн) содержала (в г на 1 литр дистиллированной воды): KH_2PO_4 - 0.2; MgCl_2 - 0.1; NH_4Cl - 0.5; KCl - 0.2; NaCl - 1.0; Na_2CO_3 - 3.0; NaHCO_3 - 10.0.

Низкоминерализованная среда Монголия (среда Мн) содержала (в г на 1 литр дистиллированной воды): NH_4Cl 0.5; KH_2PO_4 , 0.2; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02; KCl 0.2; NaCl , 3.0; Na_2CO_3 , 15.0; NaHCO_3 , 20.0.

Высокоминерализованная среда Магади (среда М) содержала (в г на 1 литр дистиллированной воды): KH_2PO_4 - 0.2; MgCl_2 - 0.1; NH_4Cl - 0.5; KCl - 0.2; NaCl - 60.0; Na_2CO_3 – 68.0; NaHCO_3 – 38.0.

Модифицированная «среда Пфеннига» (среда Пф) (Pfennig 1965) содержала (в г на 1 литр дистиллированной воды): 0.33 KH_2PO_4 ; 0.33 NH_4Cl ; 0.33 KCl ; 0.33 $\text{MgCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0.33 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 2.0 NaHCO_3 .

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

Раствор микроэлементов по (Кевбрин и Заварзин, 1992) (мг на 1 литр дистиллированной воды): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{FeSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (соль Мора) 784; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 238; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{NiSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 395; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 24; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 33; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 144; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2; Na_2SeO_4 94; HBO_3 6; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 99.

Раствор витаминов по (Wolin et al., 1963) содержал (мг на 1 литр дистиллированной воды): 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 5.

Синтезированный ферригидрит (СФ) готовили путём титрования раствора $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (60 г/л) раствором NaOH (10% (вес/об.)) до pH 8.0 - 9.0.

Синтезированный магнетит готовили путём титрования эквимольных количеств $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ и $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ раствором NaOH (10% (вес/об.)) до pH 8.0 - 9.0.

Синтезированный оксид MnO_2 готовили путем окисления кислородом воздуха раствора $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (20 г/л) в щелочных условиях (NaOH (4% (вес/об.)), pH 12.5-13.0) (Feng et al., 2004).

Среду разливали под током газа по 10 мл в пробирки Хангейта (Bellco Glass, NJ) объёмом 17 мл. Для исследования литотрофного роста с молекулярным водородом (100 или 10% об.) объём среды уменьшали до 5 мл. Среды стерилизовали автоклавированием при 120 °C (1.5 атм.) в течение 60 минут. Пересевы осуществляли анаэробно стерильными одноразовыми шприцами.

Накопительные культуры получали инокулированием в культивационные среды 10% (об.) пробы и инкубированием при 35 или 60 °C в темноте или на свету. После трёх успешных 5% (об.) пересевов чистые культуры получали методом последовательных десятикратных разведений и/или выделением колоний в ролл-тюбах (2.0% Vacto Agar). Чистота культуры

подтверждалась прямым микроскопированием при различных условиях культивирования и секвенированием гена 16S рРНК (или полногеномного секвенирования).

2.3. Определение морфологических, физиологических и метаболических свойств

2.3.1. Микроскопия

Морфологию и рост клеток изучали при помощи световой фазово-контрастной микроскопии (микроскопы Zeiss, Olympus) или флуорисцентной микроскопией (микроскоп Zeiss). Количество клеток определяли прямым подсчетом. При использовании сред с минералами клетки окрашивали акридин оранжевым в соотношении 1:1; разведение учитывали при расчёте концентрации клеток.

Исследования ультраструктуры клеток проводили с помощью электронного микроскопа JEM-100 (JEOL). Тотальные препараты готовили методом негативного окрашивания фосфо-вольфрамовой кислотой (Brenner and Horne, 1959), ультратонкие срезы окрашивали уранил ацетатом и цитратом свинца (Spurr, 1969).

2.3.2. Диапазоны температуры, pH и концентрации NaCl

Температурный диапазон роста микроорганизмов (от 10 до 50 °C) определяли в жидкой среде, используя набор термостатов, установленных на различные температуры. Диапазон роста и оптимальные значения pH среды (от 7.0 до 11.0) путем титрования сред растворами 6M HCl или 12M NaOH (вес/об.). Финальные значения pH измеряли после стерилизации при комнатной температуре с помощью pH-метра (pH-метр, Hanna HI 991001, Германия). Для определения диапазона солености (0-30%) навески NaCl вносили в жидкую среду до стерилизации, минимизируя концентрацию карбонатов. Потребность в карбонатах определяли путем их замены эквимольным количеством сульфатов и хлоридов и поддержанием оптимальных значений pH органическими буферами CAPS (20 mM) или TRIS (20 mM). Оптимальное содержание карбонатов определяли путем добавления их в разной концентрации с поддержанием постоянной общей минерализации путем добавления сульфатов.

2.3.3. Использование доноров и акцепторов электронов

Растворимые субстраты и акцепторы электронов добавляли в пробирки из стерильных анаэробно приготовленных концентрированных растворов перед инокулированием. Нерастворимые субстраты и элементную серу добавляли в каждую пробирку перед стерилизацией. Для тестирования молекулярного водорода в качестве донора электронов, среду разливали в пробирки, заполняя 100% H₂. Небольшие количества (до 10%) газообразных

доноров или акцепторов электронов (H_2 , O_2) добавляли в газовую фазу закрытых пробирок или флаконов стерильно шприцом.

Способность микроорганизмов к использованию различных субстратов определяли путем трех последовательных пересевов. Используемым считали субстрат, на котором конечная концентрация клеток в третьем пересеве, по меньшей мере, в три раза превышала рост в контроле без субстрата.

Способность микроорганизмов использовать в качестве акцепторов $Fe(III)$, $Mn(IV)$, 9,10-антрахинон-2,6-дисульфат (AQDS), $Fe(III)$ -ЭДТА и O_2 тестировали в средах, не содержащих восстанавливающих агентов. В качестве контроля всегда проверяли рост культуры на той же среде без добавления акцептора. Об использовании потенциального акцептора электронов судили по увеличению конечной концентрации клеток по сравнению с контролем и по образованию продуктов восстановления. При восстановлении $Fe(III)$ коричнево-рыжий осадок превращался в черный осадок меньшего объема с магнитными свойствами. Восстановление и $Mn(IV)$ сопровождалось изменением цвета и объема осадка. Восстановление AQDS, $Fe(III)$ -ЭДТА и соединений серы качественно определяли по изменению цвета культуральной среды и/или образованию сульфида. Кроме того, проводили количественное определение продуктов восстановления акцепторов электронов (см. ниже Аналитические методы).

Все эксперименты проводили, как минимум, в двух повторностях.

2.3.4. Чувствительность к антибиотикам

Для определения чувствительности к антибиотикам среду, содержащую 100 мкг/мл или 50 мкг/мл антибиотика, инокулировали 5% (об.) тестируемой культуры и инкубировали при оптимальной температуре в течение двух недель.

2.4. Аналитические методы

2.4.1. Колориметрические методы.

Восстановление $Fe(III)$ в культурах микроорганизмов определяли путем измерения образующегося $Fe(II)$. Двухвалентное железо измеряли спектрофотометрически с феррозином (Stookey, 1970) после 30-минутной экстракции образца объемом 0.2 мл в 0.2 мл 6 N HCl. Газы (H_2 и O_2) измеряли с помощью газового хроматографа Кристалл 5000.2 (Хроматэк, Россия), оснащенного детектором TCD и колонкой Molecular sieve 5A (1 м), с аргоном в качестве газ-носителя. Анализ короткоцепочечных органических кислот, спиртов, сахаров, глицерина определяли с помощью хроматографа Stayer HPLC (Аквилон, Россия), оснащенного рефрактометрическим детектором (Knauer, Германия) и колонкой Aminex HPX-87H (Bio-Rad,

США), с использованием в качестве подвижной фазы 5 мМ H₂SO₄ со скоростью потока 0.6 мл/мин. Сульфид измеряли колориметрически с диметил-*p*-фенилендиамином (Trüper and Schlegel, 1964). Переход Si в раствор – колориметрически с молибдатом аммония и солью Мора (Лурье, 1971). Оксидазную и каталазную активности проверяли стандартными методами (Герхардт и др., 1983).

2.4.2. Хемотаксономический анализ

Клетки для хемотаксономического анализа выращивали в оптимальных условиях до поздней логарифмической- ранней стационарной фазы роста. Содержание клеточных жирных кислот определяли методом газовой хроматографии-массовой спектрометрии (GC-MS). Дыхательные липохиноны экстрагировались холодным ацетоном и после разделения сырых веществ методом ТСХ основную УФ-поглощающую полосу элюировали и исследовали методом тандемной масс-спектрометрии (LCG Advantage Max) с химической ионизацией при атмосферном давлении. Хиноны идентифицировались по ионной массе при помощи ВЭЖХ масс-спектрометрии. Для определения содержания Г+Ц нуклеотидных оснований, геномную ДНК из чистых культур выделяли методом Мармура (Marmur, 1961). Г+Ц состав определяли по температуре плавления ДНК (T_m) (Marmur and Doty, 1962) с ДНК *Escherichia coli* K-12 в качестве контроля, а также по результатам полногеномного секвенирования.

2.4.3. Молекулярные методы

2.4.3.1 Выделение ДНК

Для выделения ДНК из чистых и накопительных культур клетки собирали центрифугированием при 12000 g в течение 10 мин. Тотальную ДНК выделяли с помощью набора DNeasy PowerLyzer Microbial Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя, включая этап механического разрушения клеток на гомогенизаторе FastPrep-24 (MP Biomedicals, USA).

В ряде случаев ДНК выделяли с помощью фенол-хлороформного метода. Клетки разрушали обработкой лизоцимом (1 мг/мл лизоцима в буфере, содержащем 1 мМ ЭДТА, 100 мМ Трис-НСl, (рН 8.0), 0.75 М сахарозы, 37 °С, 30 мин) и протеиназой К (20 мг/мл протеиназы К, 55 °С, 1.5-2 ч) в присутствии 0.5% додецилсульфата натрия. Полученные лизаты охлаждали до 0 °С во льду и добавляли к ним раствор 5 М NaCl до конечной концентрации 1 М. ДНК из лизатов экстрагировали один раз смесью фенол-хлороформ (1:1) и дважды хлороформом и осаждали этанолом. Осадок растворяли в ТЕ буфере (Маниатис и др., 1984), обрабатывали раствором РНК-азы и переосаждали изопропиловым спиртом. Полученную ДНК растворяли в ТЕ буфере и использовали в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Концентрацию выделенной ДНК измеряли с помощью набора Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) на флуориметре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Пробирки с элюированной тотальной ДНК хранили при температуре -20 °С.

ПЦР. Фрагменты генов 16S рРНК были получены путем прямой амплификации геномной ДНК. Библиотеки ампликонов V4 участка гена 16S рРНК для высокопроизводительного секвенирования на системе Illumina MiSeq были приготовлены по схеме, описанной в статье Gohl et al., 2016. Использовалась следующая система праймеров: прямой праймер (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGAGT TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT XXXXXXXXXXXXX ZZZZ GTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3'), состоящий, соответственно, из «5' Illumina Linker Sequence», «Index 1», «Heterogeneity Spacer» (Fadrosh et al., 2014) и 515F праймерной последовательности (Hugerth et al., 2014); обратный праймер (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT XXXXXXXXXXXXX ZZZZ GACTACNVGGTMTCTAATCC-3'), состоящий из «3' Illumina Linker Sequence», «Index 2», «Heterogeneity Spacer» и Pro-mod-805R праймерной последовательности (Merkel Merkel et al., 2019), соответственно. Реакции амплификации проводили в смеси (конечный объем 25 мкл), содержащей 1 мкл раствора матричной ДНК с концентрацией, не превышающей 5 нг/мкл, 5 мкл смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, РФ), по 0,25 мкл каждого из праймеров со стоковой концентрацией 25 мкМ и 18.5 мкл воды. Режим проведения ПЦР: первичная денатурация в течение 3 минут при температуре 95 °С, затем 32 цикла: денатурация 25 сек при 95 °С, отжиг 20 сек при 56 °С, элонгация 30 сек при 72°С, затем финальная элонгация при 72 °С в течение 20 минут. Во всех экспериментах в качестве отрицательного контроля использовали реакцию без добавления ДНК. Амплификации проводили на амплификаторе StepOnePlus Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). При необходимости продукты амплификации (5 мкл) анализировали электрофорезом в агарозном геле (1.5-2.0% (вес/об.)) в Трис-ацетат-ЭДТА буфере (Маниатис и др., 1984). Для визуализации сигналов в прокрашенном бромистым этидием (0.5 мкг/мл) геле использовали УФ-трансиллюминатор (длина волны 320 нм).

Очистку ампликонов проводили с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, РФ). Далее очищенные ПЦР-продукты смешивали и проводили очистку с помощью препаративного гель-электрофореза (концентрация агарозы 2%). Финальную библиотеку ПЦР продуктов необходимого размера (примерно 420 п.н.) вырезали из геля и очищали, используя набор Cleanup Standard.

2.4.3.2. Количественная ПЦР (кПЦР)

Для определения численного соотношения копий геномов *Geoalkalibacter ferrihydriticus* и *Candidatus* “*Contubernalis alkalaceticum*” в образцах проводили кПЦР в реальном времени с использованием специфических систем праймеров GeoFer_532F - 5'-GGACCGATACTGACGCTGAG-3' и GeoFer_829R - 5'-AGCCGAACTGACCCTCCTAT-3' для *G. ferrihydriticus*; Contuber91F - 5'-AGCTGTTACCTAGTGGCGAA-3' и Contuber313R - 5'-CCGTGTCTCAGTCCCAGTG-3' для *Candidatus* “*C. alkalaceticum*”. Специфичность используемых систем праймеров была проверена с помощью программы TestPrime 1.0 (Klindworth et al., 2013). кПЦР проводили с помощью амплификатора StepOnePlus Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) и смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Использовали следующий режим кПЦР: денатурация ДНК при 95 °С - 5 мин; 40 циклов денатурации ДНК 95 °С в течение 20 сек, отжига праймеров при 62 °С в течение 20 сек, элонгации ампликона при 72 °С в течение 25 сек. Для калибровочных кривых использовали геномные ДНК *G. ferrihydriticus* и *Candidatus* “*C. alkalaceticum*”. Точки для калибровочной кривой, образцы и отрицательные контроли амплифицировали в трех технических повторностях.

2.4.3.3. Секвенирование библиотек ампликонов

Высокопроизводительное секвенирование полученных на предыдущей стадии библиотек производили с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300-cycles) MS-103-1002 (Illumina, США) на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) в соответствии с инструкцией производителя. Сравнение нуклеотидных последовательностей с последовательностями генов 16S рРНК, содержащимися базе данных GenBank NCBI (Benson et al., 1999) проводили при помощи программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Altschul et al., 1990).

2.4.3.4. Филогенетический анализ

Для филогенетического анализа чистых культур выделяли геномную ДНК как описано выше и избирательно амплифицировали ген 16S рРНК с помощью ПЦР с универсальной парой праймеров 27F-1429R (Lane, 1991). Реакции амплификации проводили в смеси (конечный объем 50 мкл), содержащей 50-100 нг матричной ДНК, 5 пмоль каждого праймера, 12.5 нмоль каждого трифосфата дезоксирибонуклеотида, 3.0 ед. активности *Taq* ДНК полимеразы в 5 мкл 10-кратного реакционного буфера. ПЦР проводили по следующей программе: денатурация ДНК при 94°С в течение 9 мин; 30 циклов, состоящих из денатурации (94 °С, 60 с), отжига

праймеров (55 °C, 60 с) и элонгации (72 °C, 60 с); и заключительная элонгация при 72 °C в течение 7 мин. Полученные продукты ПЦР очищали при помощи набора реактивов 117 Wizard PCR Preps kit (Promega, США), согласно инструкциям производителя. Ген 16S рРНК был секвенирован в обоих направлениях с использованием праймеров 27F, 357F, 530F, 1114F, 342R, 519R и 1492R (Lane, 1991) на автоматическом секвенаторе (см. выше). Нуклеотидную последовательность гена собирали из полученных фрагментов длиной 500-800 п.н. с помощью программы BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Сравнение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК выделенных чистых культур с последовательностями генов 16S рРНК, содержащимися базе данных GenBank NCBI (Benson et al., 1999) проводили при помощи программ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Altschul et al., 1990) или EzTaxon-e server (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>, Chun et al., 2007; Kim et al., 2012; Yoon et al., 2017). Выравнивание последовательностей генов 16S рРНК выбранных родственных микроорганизмов проводили с помощью программ CLUSTAL W или MUSCLE, входящих в пакет программ для филогенетического анализа MEGA (Tamura et al., 2007; 2011; 2013). Этот же пакет программ использовали для построения филогенетических деревьев.

2.4.3.5. Анализ геномов

Анализ полноразмерных геномов проводили при помощи он-лайн сервисов RAST (<http://rast.theseed.org>) и IMG/M (<https://img.jgi.doe.gov>). Предполагаемые цитохромы с идентифицировали по наличию Cys-Хаа-Хаа-Cys-His пептидных последовательностей. Белки проверяли на наличие трансмембранных спиралей с помощью TMHMMServer v. 2.01 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). N-концевые сигнальные пептиды определяли при помощи он-лайн сервисов Signal Pv.4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) для грамотрицательных бактерий и PRED-TAT (<http://www.compgen.org/tools/PRED-TAT/>).

2.4.3.6. Оценка распространения новых микроорганизмов

Оценку географического распространения новых таксонов микроорганизмов проводили, используя базу данных GenBank и алгоритм BLASTn. Организмы, в том числе некультивируемые, имеющие сходство генов 16SpРНК не менее 95%, считались относящимися к одному роду (Tindall et al., 2010; Yarza et al., 2014). В анализ были включены последовательности генов 16SpРНК, длиной не менее 1400 пар нуклеотидов.

2.5. Методы исследования минералов

В работе использовались минералы железа разных классов – оксиды, карбонаты, силикаты, которые в результате жизнедеятельности микроорганизмов, трансформировались,

образуя полифазные смеси. Для биогенных минералов характерно быстрое образование, которое зачастую сопровождается дефектами в кристаллической решетке и локальные неоднородности — изменение от позиции к позиции состояния и свойств атомов одного сорта. Таким образом, для объективной оценки производимых микроорганизмами трансформаций необходимо было использовать комплекс методов, позволяющих сделать вывод об изменении состояния, например рентгеноаморфных минералов, таких как ферригидрит. В работе применяли методы Мёссбауэровской спектроскопии, порошковой рентгеновской дифракции, рамановской спектроскопии, спектроскопии электронного магнитного резонанса.

2.5.1. Метод Мёссбауэровской спектроскопии

Является одним из наиболее эффективных методов, позволяющих получить информацию локального характера (структурное, зарядовое, спиновое состояния мёссбауэровских атомов). Этот метод дает возможность определить относительное содержание атомов железа в различных фазах, в том числе в случае малого количества исследуемой фазы по отношению к общему количеству образца. Метод Мёссбауэровской спектроскопии основан на эффекте Мёссбауэра и используется для исследования сверхтонких изменений в структурах железосодержащих фаз, как неорганических, так и органических, вызванных взаимодействием ядра ^{57}Fe с внеядерными электрическим и магнитным полями.

Для проведения Мёссбауэровских исследований минералы, полученные контрольных и опытных образцов, растирались в яшмовой ступке с добавлением этилового спирта. После испарения спирта образцы представляли собой однородные порошки, которые помещались в плексигласовые бюксы. В ряде случаев с целью уменьшения окисления образцов в процессе измерений порошки фиксировали парафином (Hoechst Wachs C $\text{C}_{38}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_2$), после чего полученная смесь спрессовывалась в таблетки. Мёссбауэровские спектры образцов были получены на кафедре общей физики физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова на спектрометре MS-1104Em и спектрометре производства WissEl в конфигурации: Mossbauer Drive Unit MRG-500, MVT-100, Proportional Counter LND-45431, Proportional Counter Preamplifier PEA-6, High-Voltage Supply HVS-2, CMCA-550)). Спектрометры работали в геометрии поглощения в режиме постоянных ускорений. Спектры регистрировались анализатором в 1024 или 512 канала. В качестве источника γ -квантов использовался изотоп ^{57}Co в матрице Rh. Для измерений Мёссбауэровских спектров при температурах в диапазоне от 78 – 220 К использовался малогабаритный криогенный комплекс, произведенный в ЦМИИ ВНИИФТРИ. Мёссбауэровские измерения при температуре $T = 5.5$ К проводились с использованием гелиевого криостата замкнутого цикла (JANIS RESEARCH серия SHI-850-5).

Гелиевый криостат позволяет проводить эксперименты в диапазоне температур от 5 К до 300 К.

Обработка экспериментальных Мёссбауэровских спектров проводилась с помощью программы SpectrRelax (Matsnev and Rusakov, 2012). Эта программа позволяет существенно расширить экспериментальные возможности Мёссбауэровской спектроскопии, что позволило получить ряд важных результатов, например, разделить спектры исходного и новообразованного сидерита. Целью модельной расшифровки Мёссбауэровских спектров является нахождение оптимальных значений физических параметров $\{a_i\}$, однозначно определяющих огибающую полученного спектра. В качестве варьируемых параметров для парциальных спектров использовались величины, имеющие непосредственный физический смысл: относительная интенсивность парциальных спектров (I), сдвиг Мёссбауэровской линии (δ), квадрупольное смещение компонент спектра (ϵ), сверхтонкое магнитное поле (H_n), ширины резонансных линий (Γ). Поиск оптимальных значений параметров модели осуществляется в соответствии с критерием χ^2 методом Левенберга – Марквардта. Для обработки Мёссбауэровских спектров суперпарамагнитных частиц (наноразмерных частиц магнетита) использовалась модель многоуровневой суперпарамагнитной релаксации (Jones and Srivastava, 1986).

2.5.2. Метод порошковой рентгеновской дифракции

Для определения состава минеральных смесей, содержащих не только минералы железа, а также для проверки чистоты железосодержащих минеральных фаз использовался метод порошковой рентгеновской дифракции. Принцип метода заключается в получении зависимости интенсивности рассеянного излучения от угла дифракция 2θ . Геометрия, параметры и интенсивность полученных пиков дают информацию об элементарной ячейке кристалла, а также функции распределения электронной плотности внутри кристалла. Дифрактограммы измерялись на дифрактометре PANalytical Empyrean с использованием медного анода ($\lambda = 1.5405 \text{ \AA}$, рабочие режимы $I = 40 \text{ mA}$, $U = 40 \text{ kV}$) в геометрии Брегга-Брентано с использованием двухкоординатного детектора Pixel3D и системы варьируемых щелей. Фазовый анализ дифрактограмм проводился с помощью программного обеспечения HighScore Plus (PANalytical) с применением кристаллографической базы данных ICSD PDF2. Измерения проводили на кафедре физики твердого тела физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

2.5.3. Рамановская спектроскопия

В основе метода лежит явление комбинационного рассеяния света в результате взаимодействия электромагнитного излучения с веществом, сопровождающееся изменением

частоты света. Для получения рамановских спектров использовался сканирующий конфокальный лазерный рамановский микроспектрометр DXR (Thermo Scientific Corporation). Длина волны возбуждения 780 нм, спектральное разрешение 5 см^{-1} , диапазон измерения 34–600 см^{-1} . Излучение фокусировалось объективом Olympus LMP1an FLN 50X/0.75BD. Диаметр перетяжки лазерного пучка на образце составляет около 1 мкм, средняя мощность лазерного излучения на образце 5 мВ. Время записи спектра составляло 600 с. Спектры регистрировались при комнатной температуре. Для каждого образца произвольно выбирали пять точек и записывались спектры. В дальнейшем эти спектры складывались. Измерения проводились на кафедре общей физики и волновых процессов физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

2.5.4. Спектроскопия электронного магнитного резонанса

Является эффективным методом для изучения магнитных свойств железосодержащих нанообъектов. В работе применялся метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Измерения спектров ЭПР проводили при комнатной температуре на спектрометре X-диапазона с частотой 9.12 ГГц, сопряжённом с персональным компьютером. Спектры записывали с использованием модуляционной частоты 100 кГц, амплитуды модуляции 10 Э, микроволновой мощности 10 мВт, шириной развертки магнитного поля 4 кЭ. Образцы в виде мелкодисперсных порошков на дне кварцевой ампулы (диаметр 4 мм) помещали в центр прямоугольного резонатора с модой TE_{102} . Для проверки ненулевой остаточной намагниченности образцов проводилась регистрация гистерезиса микроволнового поглощения в нулевом магнитном поле. Измерения проводились на кафедре общей физики физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

2.5.5. Метод сканирующей электронной микроскопии

Метод использовали для визуализации изменений морфологии твердых фаз, происходящих под воздействием микроорганизмов. Исследования проводили на приборе TESCAN VEGA 3 LMU с системой энергодисперсионного анализа INCA Energy 350/X-max 80 (OXFORD Instruments NanoAnalysis, Великобритания). Образцы были предварительно закреплены двусторонней углеродной лентой и трижды покрыты Au.

2.5.6. Метод пиролиза Rock-Eval33

Метод использовали для определения органического углерода минеральных фаз. Измерения проводили на рабочей станции HAWK Resource Workstation (Wildcat Technologies, США). Основными измеряемыми органическими параметрами были S1 (свободная нефть) - количество термически освобожденных углеводородов ($C_8 \div C_{15+}$) в образце, полученное после

нагрева образца до 300 °С; S2 (выход керогена) - количество углеводородов, образовавшихся в результате термического (300÷650°С, нагрев 25°С/мин) крекинга нелетучего органического вещества (керогена); и S3 (выход органического диоксида углерода) - количество CO₂, образующегося при пиролизе керогена, соответствующее выходу органического диоксида углерода в породе и измеренное с помощью инфракрасной (ИК) ячейки. Общее содержание углерода (масс. %) рассчитывали по методике (Espitalié and Bordenave, 1993) на основе измеренных параметров. Измерения проводили на кафедре горючих полезных ископаемых геологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

2.6. Термодинамические расчеты

Расчеты равновесного состояния для системы (H-C-O-Na-Fe) проводились с использованием программы HCh (Shvarov, 2008, 2015). Для расчета равновесного состояния была определена минимальная свободная энергия системы. Термодинамическая модель была проанализирована для определения пропорций фаз и состава растворов, которые соответствуют термодинамическому равновесию. Следует отметить, что такое равновесие не было достигнуто в ходе экспериментов. Расчеты использовались для определения того, в каком направлении движутся процессы.

Изменения свободной энергии Гиббса реакций рассчитывали с помощью программы HCh, а термодинамические свойства компонентов брали из базы данных Unitherm (Shvarov, 2015). Значения для стандартного состояния (ΔG°_r) были пересчитаны для реальных значений pH, получены бикарбонатная активность и свободная энергия для реакций с экспериментальными активностями компонентов (ΔG_r).

ГЛАВА 3. АЛКАЛОФИЛЬНЫЕ ЖЕЛЕЗОРЕДУЦИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ

3.1. Оценка распространенности процесса диссимиляционной железоредукции в содовых озерах.

Для оценки распространенности процесса диссимиляционной железоредукции были использованы пробы донных осадков нескольких содовых озер Алтая, Тувы и Восточной Африки, отобранные в разные годы автором и сотрудниками Института микробиологии им. С. Н. Виноградского. Для культивирования использовали среды *M* и *Xn* (раздел 2.2.), в состав которых не входил сульфат. В качестве доноров электронов использовали молекулярный водород или ацетат, в качестве акцептора - СФ (90 мМ Fe(III)). Определение численности железоредукторов проводили методом десятикратных разведений. О процессе судили по восстановлению ферригидрита, определяя Fe(II) с феррозином. Объединенные результаты исследований, представленные на рисунке 5 позволяют сделать вывод, что процесс диссимиляционной железоредукции широко распространен в содовых озерах, поскольку был обнаружен в пробах из всех без исключения исследованных озер. Численность диссимиляционных железоредукторов составляла 10^5 - 10^6 кл/мл. Во всех пробах восстановление с молекулярным водородом шло интенсивнее, чем с ацетатом.

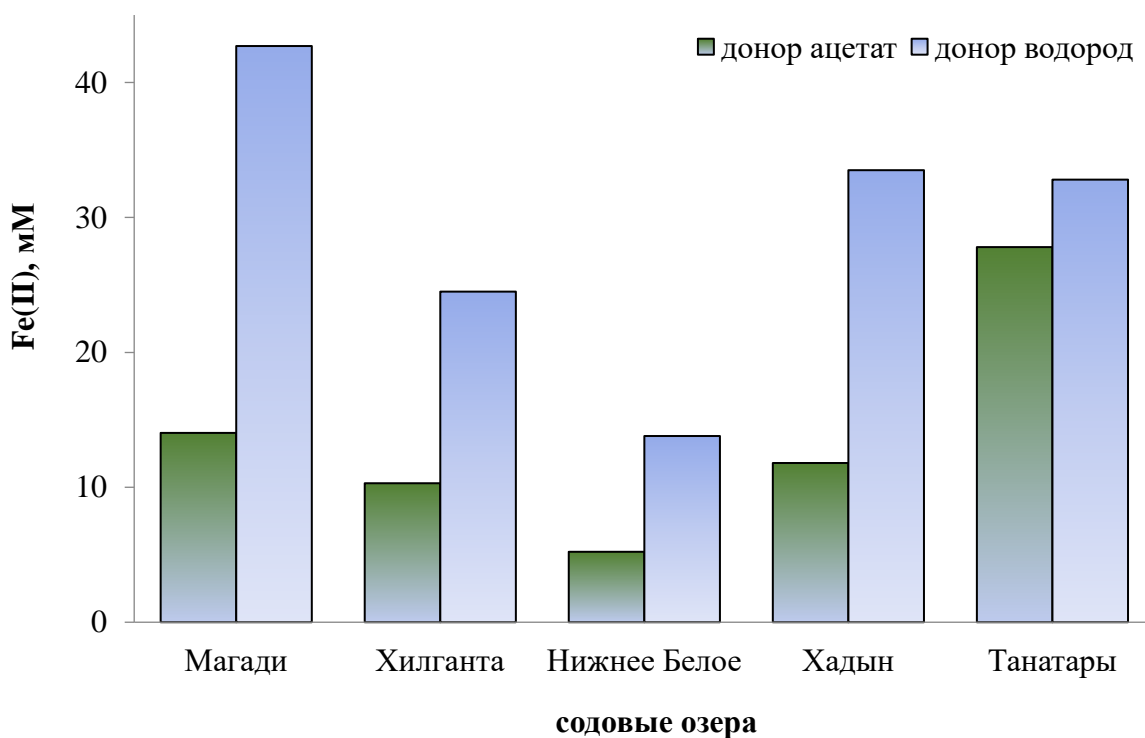


Рисунок 5. Восстановление синтезированного ферригидрита алкалофильными диссимиляционными железоредукторами в содовых озерах разных климатических зон.

3.2. Новые литоавтотрофные алкалофильные железоредукторы

3.2.1. *Geoalkalibacter ferrihydriticus* Z-0531^T gen. nov., sp. nov.

Источник выделения. Штамм Z-0531^T был выделен из донных осадков содового озера Хадын (Тыва, Российская Федерация; рН 9.5; минерализация 17 г/л), отобранных соавторами данной работы в августе 1994 г., методом десятикратных разведений на среде X, содержащей ацетат (2 г/л) в качестве донора электронов, синтезированный ферригидрит (90 мМ Fe(III)) в качестве акцептора электронов и дрожжевой экстракт (0.1 г/л) в качестве фактора роста.

Морфология клеток изменялась в зависимости от субстрата. Клетки, выращенные на ацетате, представляли собой короткие слабоподвижные неспорообразующие палочки размером 1.0-1.5×0.3-0.5 мкм. (Рис.6а), в то время как при росте на пирувате некоторые клетки достигали длины 5 мкм и были более подвижными. Клетки располагались поодиночке, парами, редко цепочками по 4-5 клеток, характеризовались Грам-отрицательным строением клеточной стенки (Рис.6б). Подвижность была обусловлена наличием от одного до трех боковых жгутиков (Рис.6в). На поверхности СФ клетки часто формировали плотные колонии (Рис.6г).

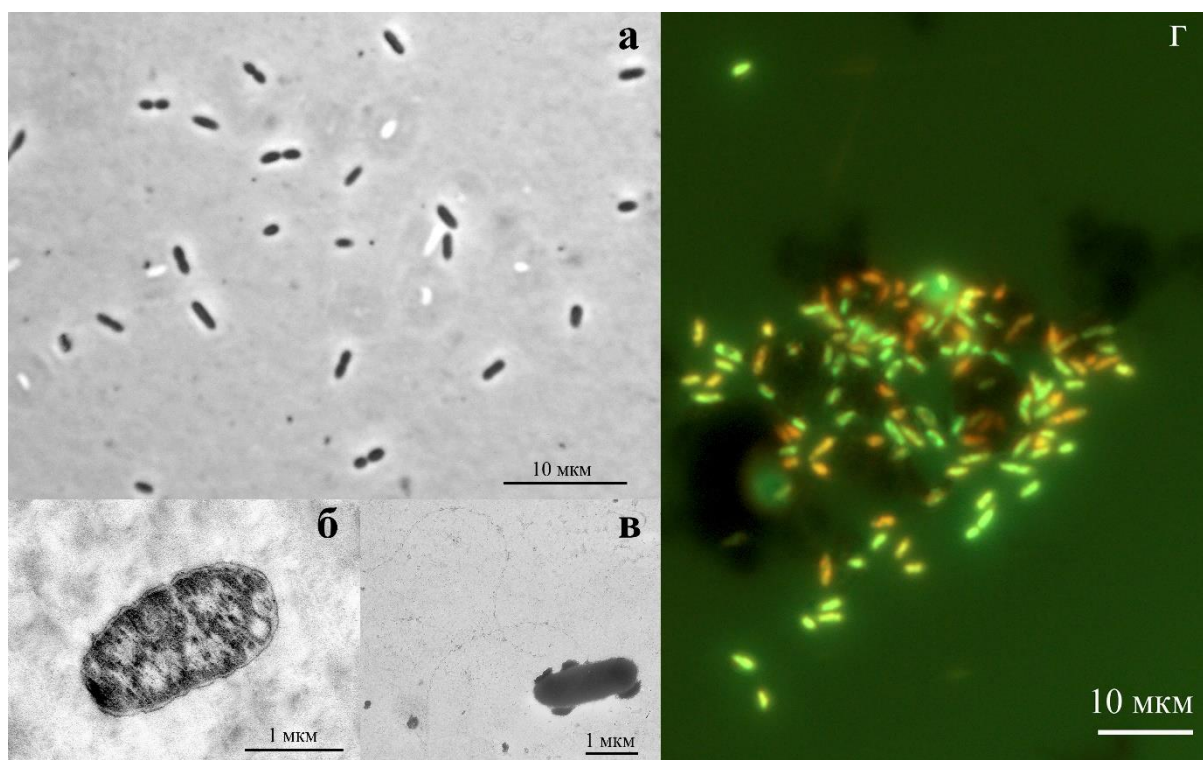


Рисунок 6. Морфология клеток штамма Z-0531^T, выращенных на среде с ацетатом и ЭДТА-Fe(III) (а-в) или СФ (г): (а) фазово-контрастная микроскопия, показывающая морфологию клеток штамма Z-0531^T; (б) ультратонкий срез, показывающий строение клеточной стенки; (в) электронная микрография негативно окрашенных клеток штамма Z-0531^T, показывающая положение жгутиков; (г) флуоресцентная микрофотография клеток штамма Z-0531^T, окрашенных акридин оранжелем, колонизирующих поверхность СФ.

Физиологические характеристики. Штамм Z-0531^T являлся алкалофилом с диапазоном роста при рН 7.8-10.0 и оптимумом при рН 8.6. Температурный диапазон роста составлял 18-39 °С, с оптимумом при Т 35 °С. Не нуждался в хлоридах и карбонатах, которые могли быть заменены органическими буферами CAPS или Tris, но выдерживал концентрацию NaCl до 50 г/л. Штамм Z-0531^T не был способен к аэробному или микроаэрофильному росту в присутствии 2% O₂ (об.) в газовой фазе, однако мог расти без добавления восстановителей – сульфида натрия (0.1 г/л) или цистеина (0.3 г/л), хотя их присутствие стимулировало рост бактерии и восстановление СФ.

По типу метаболизма штамм Z-0531^T являлся хемотрофом, не способным к сбраживанию сахаров, полисахаридов, пептидов или аминокислот. С ацетатом как донором электронов помимо СФ окислял такие акцепторы, как EDTA-Fe(III) (20 мМ), антрахинон-2,6-дисульфат (AQDS) (20 мМ), MnO₂ (Mn(IV), 25 мМ) и S⁰ (10 г/л). С ЭДТА-Fe(III) окислял ацетат, пируват, оксалат, этанол, триптон, тартрат, аргинин, серин, пропионат и лактат, но не использовал молекулярный водород. Использовал глицерин в качестве донора электронов только с S⁰ как акцептором. Способность к литоавтотрофному росту с молекулярным водородом или формиатом в присутствии витаминов была показана при росте с СФ в качестве акцептора электронов.

Способность к фиксации азота. Штамм Z-0531^T оказался способен к азотфиксации на среде, лишенной иных источников азота кроме газообразного, содержащей пируват и S⁰, в качестве донора и акцептора электронов. Клетки восстанавливали ацетилен до этилена, но нитрогеназная активность была невысокой - 1.08 мМ C₂H₂/ч на 5.5×10⁸ клеток культуры. В геноме бактерии был обнаружен ген нитрогеназной активности *nifH*, имеющий наибольший уровень идентичности его аминокислотной последовательности (от 85.1 до 91.5%) с таковым у представителей родов *Desulfuromonas*, *Geobacter* и *Pelobacter* также способных к азотфиксации (Holmes et al., 2004).

Рост штамма Z-0531^T не подавляли 100 мг/л ванкомицина или канамицина, но ингибировали хлорамфеникол, стрептомицин, пенициллин, ампициллин, новобиоцин, бацитрацин и рифампицин.

Содержание G+C в ДНК составляет 55.3%.

Филогенетический анализ. Сравнение 1504 п.н. гена 16S рРНК с базой данных GenBank выявило, что изолят входит в класс *Deltaproteobacteria*, имея примерно одинаковый уровень сходства с представителями родов *Desulfuromonas* (89.9–92.8% сходства), *Geobacter* (87.1–89.7% сходства), *Desulfuromusa* (89.6–90.4% сходства), *Pelobacter* (85.9–90.2%

сходства), и единственными видами родов *Geothermobacter*, *Geopsychrobacter*, *Malonomonas* и *Trichlorobacter* (85.9–90.2% сходства). Низкая степень сходства гена 16S рРНК полученного штамма со всеми другими, представленными в базах данных, определенно показывают, что штамм Z-0531^T представляет новый вид нового рода. На основании результатов филогенетического анализа и исследования физиологических свойств, мы предложили отнести штамм Z-0531^T к новому роду *Geoalkalibacter* с типовым видом *Geoalkalibacter ferrihydriticus* в семействе *Geobacteraceae*. Позднее, при описании второго вида *Geoalkalibacter subterraneus* sp. nov., род был перенесен в семейство *Desulfuromonadaceae* (Greene et al., 2009). Последние полногеномные филогенетические реконструкции, проведенные на основе сравнения 120 однокопийных консервативных маркерных генов показали, что род *Geoalkalibacter* представляет ветвь уровня семейства в классе *Deltaproteobacteria* (Waite et al., 2020). Таким образом, в настоящее время *Geoalkalibacter* является типовым родом нового семейства *Geoalkalibacteraceae* fam. nov. (Oren and Garrity, 2021).

Распространенность в природе. Помимо выделенного и описанного нами типового вида, на сегодняшний день род *Geoalkalibacter* включает еще один валидно описанный вид *G. subterraneus* (Greene et al., 2009) и невалидный вид “*G. halelectricus*” (Yadav et al., 2022). *G. subterraneus* - алкалолотерантный галофильный микроорганизм с оптимум рН 7.0, выделенный из нефтяных пластов Redwash (США), растущий при концентрации NaCl до 10%, способный восстанавливать Fe(III), Mn(IV) S⁰, нитрат с использованием широкого спектра органических кислот, спиртов, и пептидов, а также с водородом (Greene et al., 2009). “*G. halelectricus*” был выделен из электроактивной биопленки, полученной из накопительной культуры пробы донных осадков содового озера Лонар (Индия) (Yadav et al., 2022). Микроорганизм способен к восстановлению Fe(III), Mn(IV), сульфата и фумарата.

Анализ базы данных GenBank показал, что филоциты, относящиеся к роду *Geoalkalibacter* имеют достаточно широкое географическое и экологическое распространение (Рис.7). Тем не менее, фенотипические особенности представителей этого рода, обуславливают приуроченность его к определенным экосистемам. Наибольшее количество детектированных филоцитов относится к подземной биосфере, прежде всего, к местообитаниям, связанным месторождениями нефти. Осадки содовых и соленых озер, а также солончаки – вторая по количеству обнаруженных филоцитов экосистема. Наконец, третьей по численности зарегистрированных филоцитов рода *Geoalkalibacter* экосистемой являются электрогенные биопленки, а также микробные сообщества, связанные с коррозионными процессами. Таким образом, первичные пробы, из которых были выделены три вида рода *Geoalkalibacter*, известные к настоящему моменту, представляют собой

три экосистемы, в которых с наибольшей вероятностью можно обнаружить представителей описанного нами рода.

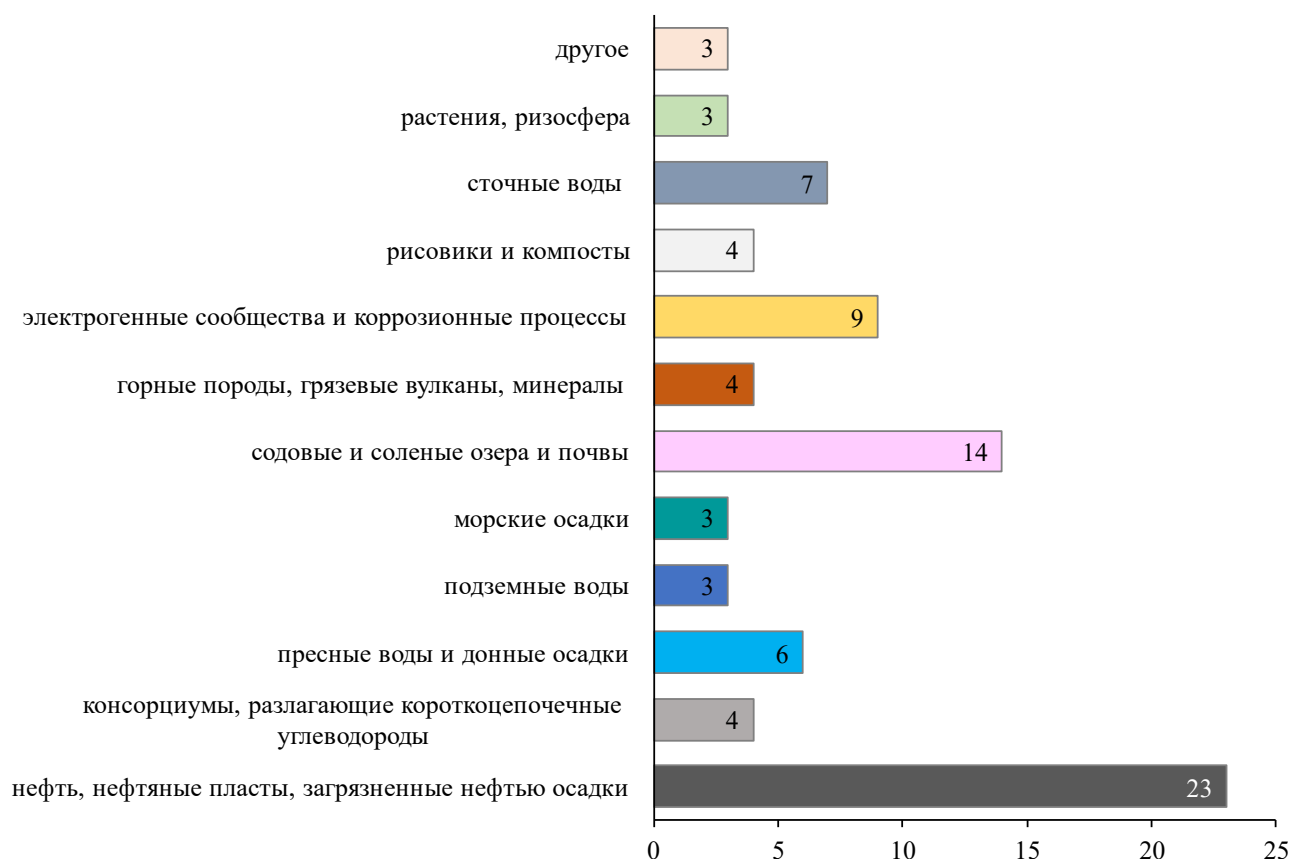


Рисунок 7. Оценка распространенности в природных и антропогенных экосистемах филотипов, относящихся к роду *Geoalkalibacter*, проведенная на основе анализа базы данных GenBank.

3.2.2. *Dethiobacter alkaliphilus*

3.2.2.1. Штамм Z-1002

Источник выделения. Штамм Z-1002 был выделен из донных осадков высокоминерализованного содового озера Магади (Кения; pH 9.5; минерализация, 170 г/л), отобранных Г.А. Заварзиным в августе 1992 г. методом десятикратных разведений на среде *M*, содержащей в качестве донора формиат (1 г/л) и синтезированный ферригидрит (45 мМ Fe(III)) в качестве акцептора электронов.

Морфология клеток. Клетки штамма Z-1002, выращенные на формиате и СФ, представляли собой короткие слабоподвижные спорообразующие палочки размером 2.0-5.0×0.3-0.5 мкм. Клетки располагались поодиночке, характеризовались Грам-положительным

строением клеточной стенки. На поверхности СФ клетки часто формировали плотные колонии (Рис.8а, б).

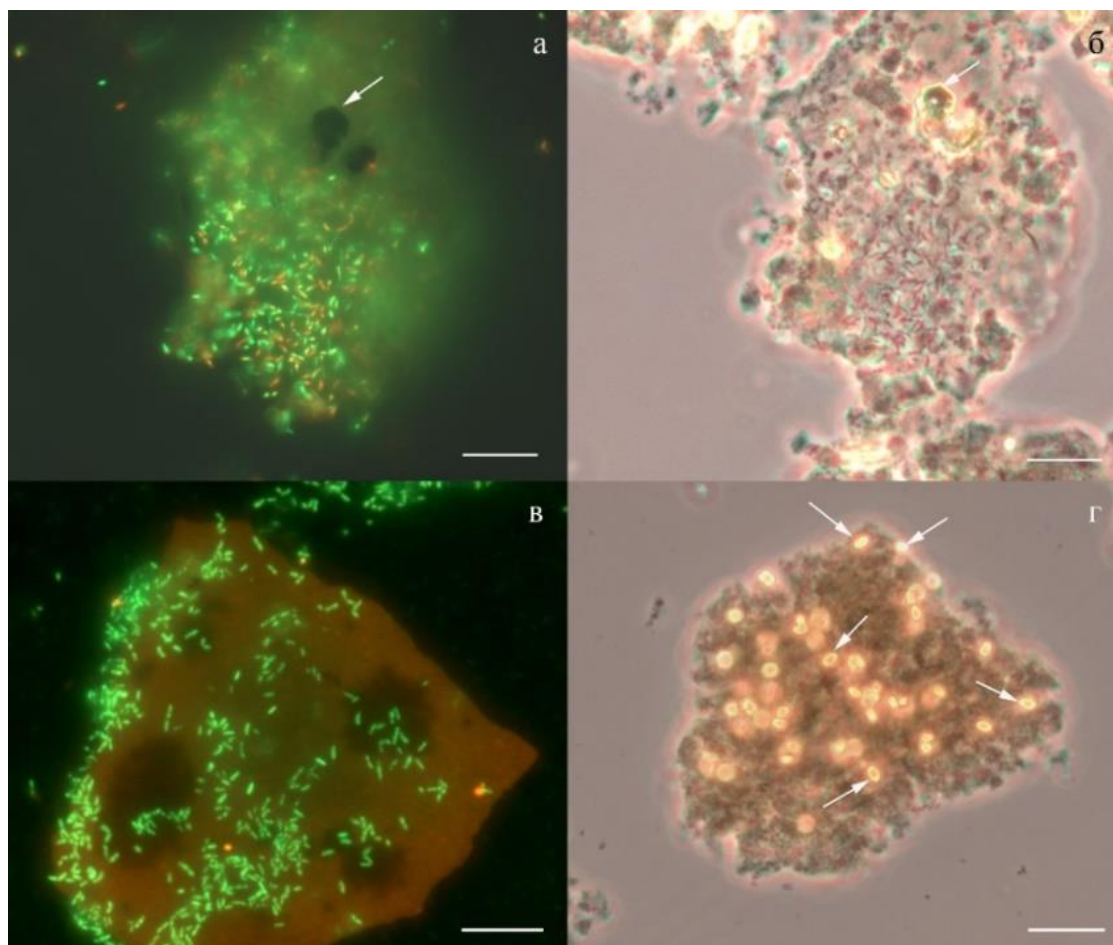


Рисунок 8. Морфология клеток штамма Z-1002 (а, б) и АНТ1^Т (в, г), выращенных на среде с молекулярным водородом и СФ: (а, в) флуорисцентные микрофотографии клеток штаммов Z-1002 и АНТ1^Т, окрашенных акридин оранжевым, колонизирующих поверхность СФ; (б, г) фазово-контрастная микроскопия, показывающая образование кристаллов магнетита (б) и сидерита (г) (стрелки) на поверхности СФ. Масштабная линейка = 10 мкм.

Физиологические характеристики. Штамм Z-1002 являлся алкалофилом с диапазоном роста при рН 7.8-10.1 и оптимумом при рН 9.2, облигатным натронофилом, не растущим на средах, в которых карбонаты были заменены органическим буфером CHES, с диапазоном роста карбонат/бикарбоната 13.5/7.5 - 82.0/45.0 г/л с оптимумом 40.0/20.0 г/л. Будучи галотолерантом, не нуждался в хлоридах, но рос в широком диапазоне 0 - 150 г/л с оптимумом 50-60 г/л. Штамм Z-1002 не был способен к аэробному или микроаэрофильному росту в присутствии 2% O₂ (об/об) в газовой фазе, но мог расти без добавления восстановителей. С СФ как акцептором электронов рос хемоорганотрофно, окисляя лактат, сукцинат, бутират, пируват, пропионат или этанол. Помимо автотрофного восстановления трехвалентного железа, восстанавливал тиосульфат с водородом, формиатом, сукцинатом,

бутиратом, пируватом, пропионатом или этанолом в качестве доноров электронов. Максимальное образование сульфида (16 мМ) наблюдалось при росте с этанолом. Элементарная сера (1 г/л), сульфит (10 мМ), сульфат (10 мМ), нитрат (5 мМ) не использовались как акцепторы электронов.

Филогенетический анализ. Сравнение 1494 п.н. гена 16S рРНК с базой данных GenBank выявило, что изолят является новым штаммом вида *Dethiobacter alkaliphilus* (Sorokin et al., 2008), имея уровень сходства с типовым штаммом АНТ1^T 99.6%. Первоначально описание филогенетического положения рода *Dethiobacter* было основано только на анализе гена 16S рРНК, который показал, что этот род представляет собой глубокую филогенетическую линию внутри филума *Firmicutes* (*Bacillota*). На основе современного подхода к филогеномной реконструкции с использованием 120 однокопийных консервативных маркерных генов (Parks et al., 2022), *D. alkaliphilus* был классифицирован как единственный вид единственного культивируемого рода в семействе *Dethiobacteraceae*, порядка *Dethiobacterales*, входящего в класс "*Dethiobacteria*" – глубокой ветви филума *Firmicutes* (*Bacillota*) (Sorokin and Merkel, 2019, 2022). Кроме *D. alkaliphilus*, этот класс включает только организмы, известные по геномам, собранным из метагеномов (MAGs). Для штамма Z-1002, так же как и для типового штамма, был собран геном, который подтвердил выводы о его филогенетическом положении, сделанные на основе анализа гена 16S рРНК.

3.2.2.2. Исследование способности к литотрофной железоредукции у типового штамма *Dethiobacter alkaliphilus* АНТ1^T

Типовой штамм *D. alkaliphilus* АНТ1^T был выделен Д. Ю. Сорокиным из смешанной пробы осадков содовых озер северо-восточной Монголии и описан, как серо- и тиосульфатредуктор, окисляющий молекулярный водород и ряд органических кислот, спиртов и сахаров (Sorokin et al., 2008). Позже была показана его способность к диспропорционированию серы или тиосульфата (Poser et al., 2013, 2016). Анализ его генома выявил наличие большого количества мультигеновых цитохромов типа МСС гомологичных таковым у диссимиляционного железоредуктора *Geobacter*, однако попытки доказать его способность к литотрофной железоредукции оказались безуспешными (Sorokin and Merkel, 2019). Штамм АНТ1^T был любезно предоставлен нам для повторных исследований Д. Ю. Сорокиным. При пересеве на среду *Mn*, содержащую СФ (50 мМ) и Н₂ (30%), с добавлением 0.2 г/л сульфида для поддержания низкого ОВП среды- удалось получить устойчивый рост штамма, сопровождающийся восстановлением СФ и потреблением водорода. После трех последовательных пересевов, в последнем из которых сульфид был исключен, штамм АНТ1^T продуцировал 5.6±0.5 мМ Fe(II), окисляя при этом 1.4±0.2 мМ

молекулярного водорода в присутствии 0.2 г/л дрожжевого экстракта с урожаем клеток $3.5 \pm 2 \times 10^7$ кл/мл. Клетки бактерии в основном образовывали плотные скопления на поверхности минеральных частиц (Рис.8 в, г). При дальнейших пересевах дрожжевой экстракт был так же исключен и доказана его способность расти литоавтотрофно.

3.2.2.3. Поиск и анализ генов, ответственных за восстановление серы и железа у штаммов АНТ1^Т и Z-1002

Сравнительный анализ геномов серного метаболизма указал на предпосылки, выявленных физиологических различий двух штаммов *D. alkaliphilus*, заключающихся в неспособности штамма Z-1002 к восстановлению серы и диспропорционированию серных соединений. У обоих штаммов отсутствовали канонические геномные детерминанты восстановления серы, сульфата или тиосульфата, такие как DsrAB или молибдоптерин-содержащие комплексы. Вместо этого каждый из штаммов обладает двумя октамерными цитохромами с-типа, слабо гомологичными сульфит-редуктазе SirA или тетрационат-редуктазе Otr из *S. oneidensis*. Реконструкция филогении показала, что эти белки имеют общий корень со структурно сходной но филогенетически далекой от сульфитных или тетрационатных октагемных редуктаз группой OmhA/OcwA Fe(III)-редуктаз (Soares et al., 2022). При этом штамм АНТ1^Т обладал дополнительным гомологом белков Otr, DealDRAFT_1454 – октагемой, наиболее глубоко ответвившейся от других предполагаемых детерминант серного дыхания у *D. alkaliphilus*. Отсутствие его близких гомологов в несероредуцирующем штамме Z-1002 делают эту октагему наиболее вероятным кандидатом в серные редуктазы штамма АНТ1^Т. На данный момент нет данных о сероредуцирующей активности октагемных тетрационат-редуктаз. Однако наличие S-S связей как в аморфной сере, так и в тетрационате позволяет предположить такую возможность, особенно если организм не обладает другими узнаваемыми детерминантами восстановления серы. Восстановление тиосульфата, выявленное у обоих штаммов *D. alkaliphilus*, вероятно, обеспечивается октагемами DealDRAFT_1917 и OMD50_RS07060, учитывая тот факт, что их гены кластеризованы в обоих геномах с генами белков роданового домена, также известных как тиосульфатные сульфуртрансферазы (Cipollone et al., 2007). Важно отметить, что эти два белка ответвляются от того же корня, что и предполагаемый серовосстанавливающий цитохром DealDRAFT_1454.

Восстановление железа обеспечивалось присутствием в геноме каждого из штаммов большого набора генов, кодирующих мультигемовые цитохромы с-типа, в том числе гомологичные хинол-оксидазам, мембрано-ассоциированным Fe(III) редуктазам, таким как OcwA или MtrA/D, и растворимым цитохромам переноса электронов, ранее

идентифицированным у модельных Fe(III)-редуцирующих бактерий родов *Shewanella* и *Geobacter* или у грамположительных термофильных Fe(III) редукторов. Реконструкция филогении мультигемовых цитохромов показала, что цитохромы, ответственные за метаболические реакции с участием железа, первичны по отношению к таковым, ответственным за метаболизм серы.

3.2.2.4. Анализ распространения представителей рода *Dethiobacter* и семейства *Dethiobacteraceae* в природе

Для анализа относительной численности *Dethiobacter* sp. в различных местообитаниях в базе данных SILVA 138.1 были взяты все последовательности гена 16S рРНК, отнесенные к роду *Dethiobacter* (Quast et al., 2013) и проанализировано сходство этих последовательностей с последовательностями гена 16S рРНК штаммов *D. alkaliphilus* АНТ1^Т и Z-1002 с помощью BLASTN (Altschul et al., 1990), с исключением всех последовательностей, имеющих менее 94.5% сходства с этими культивируемыми штаммами рода. Таким образом было получено 108 последовательностей генов 16S рРНК для анализа распределения рода *Dethiobacter* в различных типах экотопах. Далее были проанализированы метаданные, связанные с источниками обнаружения этих последовательностей; в случае, если последовательности имели близкие номера и один источник обнаружения, из этой группы последовательностей учитывалась только одна. Для анализа распространения представителей семейства *Dethiobacteraceae* были использованы метаданные, содержащие сведения о MAGs из базы данных GTDB 207 (Parks, et al. 2022).

Анализ литературных данных показал, что филоциты, связанные с *Dethiobacter*, ранее были обнаружены исключительно в щелочных средах ($\text{pH} \geq 7.5$) двух разных типов - в донных осадках содовых или меромиктических озер и в подземных экосистемах, связанных с процессами серпентинизации. Серпентинизация - это широко распространенный, постоянный в геологической истории Земли процесс, в настоящее время тесно связанный с зонами спрединга океанических хребтов. Во время непрерывного поднятия мантии ультраосновного состава, обедненной кварцем и обогащенной железом, в этих зонах первичные мантийные минералы, оливин ($(\text{Mg,Fe})_2\text{SiO}_4$) и пироксены, реагируют с водой, образуя серпентинит ($(\text{Mg,Fe})_{2-3}(\text{Si,Fe})_2\text{O}_5(\text{OH})_4$) и магнетит (Klein, 2014; Bach et al., 2006). В результате этих реакций формируются низкотемпературные, щелочные ($\text{pH} \sim 9-11$), богатые Са- и H_2 флюиды, которые взаимодействуют с морской водой с образованием карбонатов.

Проведенный анализ экологического распространения *Dethiobacters*, подтвердил редкую среди современных свободноживущих прокариот экологическую специфичность

представителей этого рода и семейства. Из природных мест обитания большинство флотипов рода *Dethiobacter* было ассоциировано со щелочными средами: либо с содовыми озерами – системами принципиально обогащенными серой, либо с обогащенными железом серпентинитами (Рис. 9а). Данные анализа распространения представителей семейства *Dethiobacteraceae* совпадали с данными рода - флотипы были обнаружены либо в содовых озерах и серпентинитах, либо антропогенных метантенках и биореакторах (Рис. 9б).

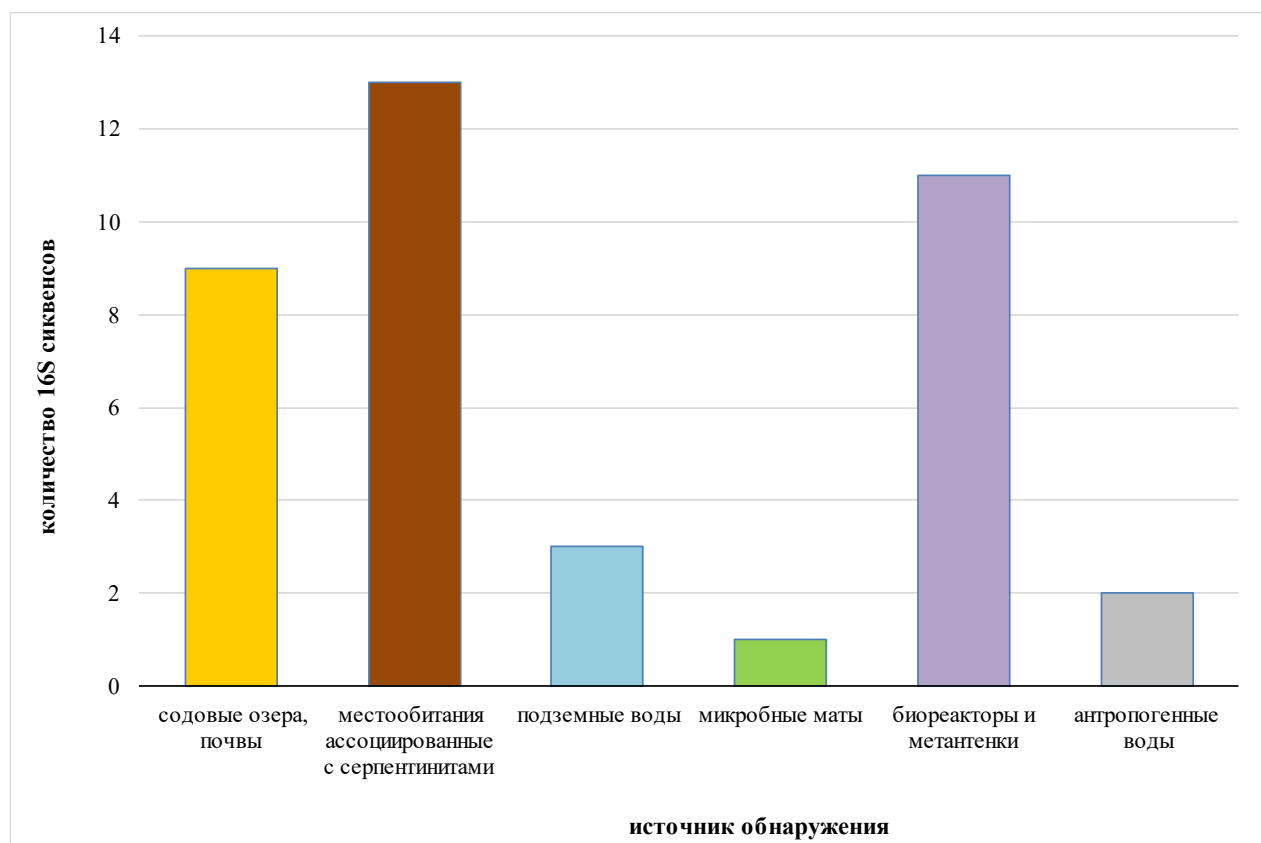


Рисунок 9а. Оценка распространенности представителей рода *Dethiobacter* на основе анализа последовательностей генов 16S рРНК.

Наличие мультигемовых цитохромов, имеющих общий филогенетический корень с OmhA/OcwA Fe(III)-редуктазами, как единственных возможных детерминант восстановления соединений серы у *D. alkaliphilus*, позволяют предполагать, что содовые озера освоены представителями этого рода позже, чем подземные континентальные и морские экосистемы, связанные с процессами серпентинизации. Это предложение хорошо согласуется с геологическим строением содового озера Магади, из которого был выделен штамм Z-1002. Оно расположено в Восточно-Африканской рифтовой долине, сложенной молодыми

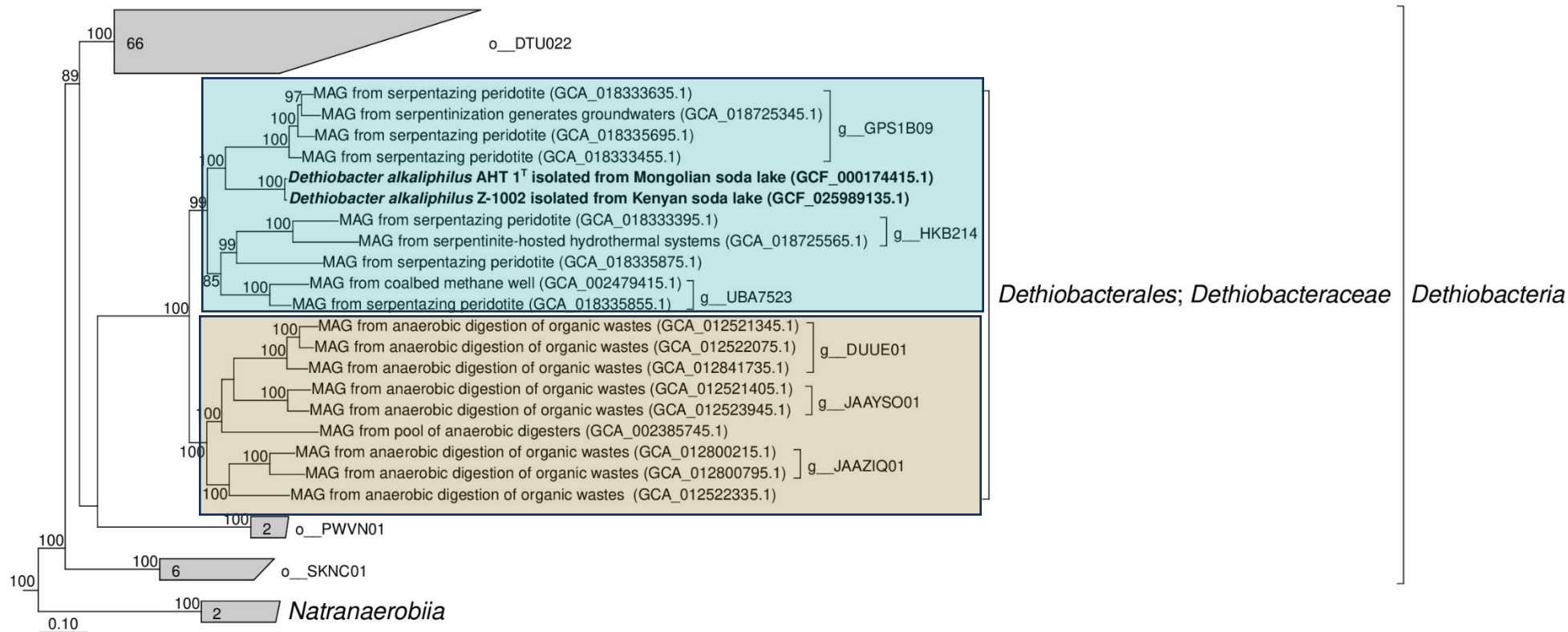


Рисунок 9б. Оценка распространенности представителей семейства *Dethiobacteraceae* в природных и антропогенных природных объектах проведенная на основе анализа метаданных базы данных GTDB 207. Зеленым выделены МАГи, относящиеся к содовым озерам и серпентинитам, коричневым - МАГи, относящиеся к антропогенным местам

плейстоценовыми щелочными базальтами, обогащенными минералами железа, и характеризуется высоким рН, концентрацией кремнезема и карбонатов и геотермальной активностью (Jones et al., 1977). Преобладающим процессом выветривания, обеспечивающим химический состав воды озера - гидролиз силикатов, в ходе которого К-полевои шпат и плагиоклаз, вулканическое стекло, пироксены, амфиболы реагируют с водой, обогащенной CO₂, имеет много общих черт с процессом серпентинизации (Schagerl and Renaut 2016). Можно предположить, что железоредуцирующий штамм *D. alkaliphilus* был привнесен туда из нижележащих, богатых Fe пород, и приобрел способность к восстановлению тиосульфата за счет модификации своего мультигемного цитохромного механизма под эволюционным давлением новых геохимических условий, в которых ведущим оказался цикл серы. Полученные данные, выходящие за рамки экологии и метаболизма только этого глубоко таксона экстремофилов, обозначили эволюционные черты, которые могли возникнуть у прокариот на переломном этапе истории биосферы, когда резкое увеличение интенсивности глобального биогеохимического цикла серы перевесило активность доминировавшего до этого на Земле цикла железа.

3.2.3. *Fuchsiella alkaliacetigena* gen. nov. Z-7100^T, sp. nov., *Fuchsiella ferrireducens* sp. nov. Z-7102^T

Источник выделения. Штаммы Z-7100^T и Z-7101^T были выделены Т.Н. Жилиной из донных осадков содового озера Танатар III (Алтай, Российская Федерация; рН 10.35; минерализация, 108 г/л), отобранных В.В. Кевбриным в июне 2008 г. Штамм Z-7100^T оказался неспособным к росту на твердых средах и был выделен методом десятикратных разведений на среде *M*, содержащей в качестве донора молекулярный водород (100%). Карбонаты, присутствующие в среде, использовались в качестве акцептора электронов. Штамм Z-7101^T был выделен из колоний выращенных на агаризованной среде с этилен-гликолем (3 г/л), как донором электронов.

Морфология клеток. Клетки штамма Z-7100^T представляли собой длинные, тонкие гибкие палочки размером 0.2-0.5×10.0-30.0 мкм. Клетки были настолько гибкими, что часто образовывали крючки или петли (Рис.10а). Подвижность обеспечивалась за счет перитрихально расположенных жгутиков (Рис.10б). На поздней стадии экспоненциального роста клетки лизировались, с образованием сферопластов (см. верхнюю стрелку на рис. 10а). Штамм Z-7100^T формирует круглые эндоспоры. На ультратонких срезах видны клеточные стенки с наружными мембранами, типичные для грамотрицательных бактерий (Рис.10в). Клетки штамма Z-7101^T были короче и толще, морфология которых зависела от фазы роста. В экспоненциальной фазе роста длина клеток составляла обычно 2.0-4.0 мкм, редко доходя до 10 мкм при толщине 0.4-0.6 мкм. В стационарной фазе роста клетки утолщались до 0.8-1.0

мкм, а затем лизировались. Формирование эндоспор наблюдалось на стационарной фазе. Подвижность осуществлялась за счет перитрихально расположенных жгутиков. Строение клеточной стенки грамотрицательное.

Физиологические характеристики. Штамм Z-7100^T являлся алкалофилом с

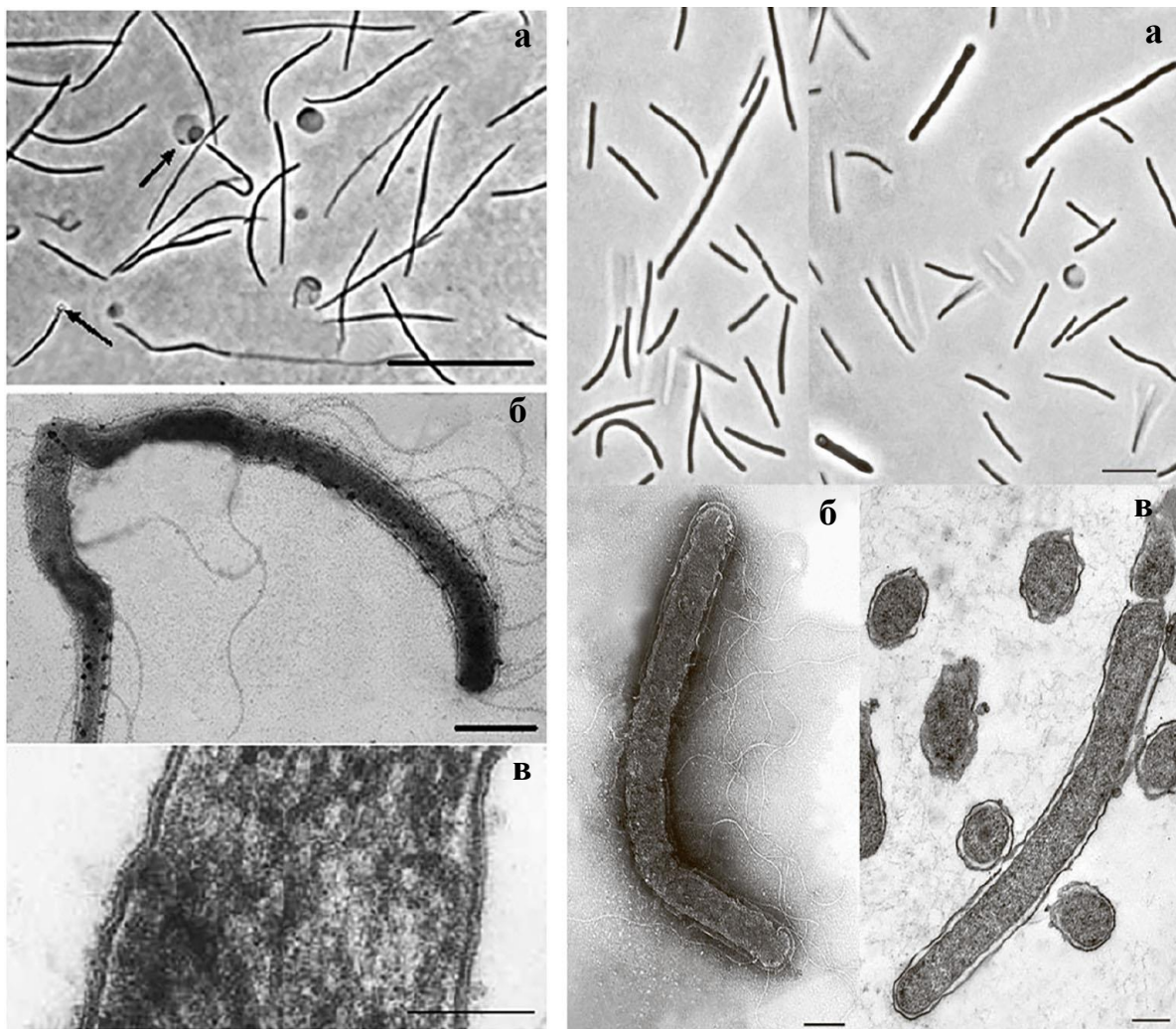


Рисунок 10. Морфология клеток штаммов Z-7100^T (слева) и Z-7101^T (справа). Световая микроскопия (а): вегетативные клетки и клетки; масштабная линейка, 10 мкм. Электронная микроскопия (б, в): клетка с перитрихально расположенными жгутиками; масштабная линейка 0.5 мкм (б); продольный ультратонкий срез клетки со структурой клеточной стенки типичной для грамположительных бактерий (в).

диапазоном роста при pH 8.5-10.7 и оптимумом при pH 8.8-9.3. Температурный диапазон роста составлял 25-45°C, с оптимумом при T 40°C. Галотолерант, не нуждающийся в хлоридах, но растущий в диапазоне NaCl 0-140 г/л, с оптимумом 85 г/л. Штамм Z-7100^T облигатно зависел от карбонатов, которые не могли быть заменены органическими буферами CAPS или Tris. Диапазон роста по концентрации Na⁺ находился в пределах 1.9–4.7 М, с оптимумом 0.94–2.35 М, по карбонатам в пределах 2.8–3.3 М с оптимумом 1.41–1.64 М. Штамм Z-7100^T являлся

облигатным анаэробом, неспособным к аэробному или микроаэрофильному росту в присутствии в газовой фазе 2% O₂ (об/об), и не рос в отсутствие восстановителей – сульфида натрия (0.5 г/л) или цистеина (0.3 г/л).

По типу метаболизма штамм Z-7100^T являлся хемотрофом, не способным к сбраживанию сахаров, полисахаридов, пептидов или аминокислот. При хемоорганотрофном росте использовал с карбонатом, как акцептором электронов, ограниченный набор субстратов – этанол, лактат или пируват. Во всех случаях ацетат являлся единственным продуктом окисления. Был способен к литоавтотрофному росту в присутствии витаминов с молекулярным водородом в качестве донора электронов и карбонатами, СФ или серой – в качестве акцептора электронов. С этанолом, как донором электронов восстанавливал нитрат (10 и 20 мМ), селенат (5 мМ) и AQDS (2 мМ) и СФ, в слабой степени тиосульфат.

Штамм Z-7101^T рос в диапазоне значений рН 8.2-10.2 и оптимумом при рН 9.8. Температурный диапазон роста составлял 25-45°C, с оптимумом при Т 30-37°C. В отличие от штамма Z-7100^T, штамм Z-7101^T был облигатным галонатрофилом, растущим в диапазоне NaCl 10-160 г/л, с оптимумом 70 г/л. Диапазон роста по концентрации Na⁺ находился в пределах 1.4–4.3 М, с оптимумом 3.3–3.8 М, по карбонатам в пределах 0.7–2.1 М с оптимумом 1.6–1.9 М. Штамм Z-7101^T являлся облигатным анаэробом, неспособным к аэробному или микроаэрофильному росту.

По типу метаболизма штамм Z-7101^T являлся хемотрофом, не способным к сбраживанию сахаров, полисахаридов, пептидов или аминокислот. При хемоорганотрофном росте с карбонатом или СФ как акцепторами электронов использовал более широкий набор субстратов по сравнению с штаммом Z-7100^T – этанол, бутанол, формиат, ацетат, лактат, пируват и этилен гликоль. Был способен к литоавтотрофному росту в присутствии витаминов с молекулярным водородом или формиатом в качестве доноров электронов и карбонатами, СФ или серой – в качестве акцептора электронов. Также как штамм Z-7100^T с этанолом, как донором электронов восстанавливал нитрат (10 и 20 мМ), селенат (5 мМ), AQDS (2 мМ) и СФ (50 мМ Fe(III)), в слабой степени тиосульфат.

Способность к использованию ацетата в качестве донора электронов при восстановлении ферригидрита не была ранее известна у ацетогенов и, скорее всего, осуществляется за счет окисления ацетил-КоА до двух молекул CO₂ через обратный (окислительный) путь ацетил-КоА, как это было показано для некоторых сульфатредуцирующих бактерий (Fuchs, 1994). По данным Мёссбауэровской спектроскопии основным восстановленным продуктом Мёссбауэровской являлся сидерит (FeCO₃).

При восстановлении молекулярного водорода штаммом Z-7101^T было зарегистрировано образование ацетата (Рис.11). Поскольку штамм Z-7101^T являлся облигатным натронофилом, мы не могли исключить карбонаты из состава среды, что означало, что фактически, в среде было два доступных акцептора электронов: Fe³⁺ и HCO₃⁻.

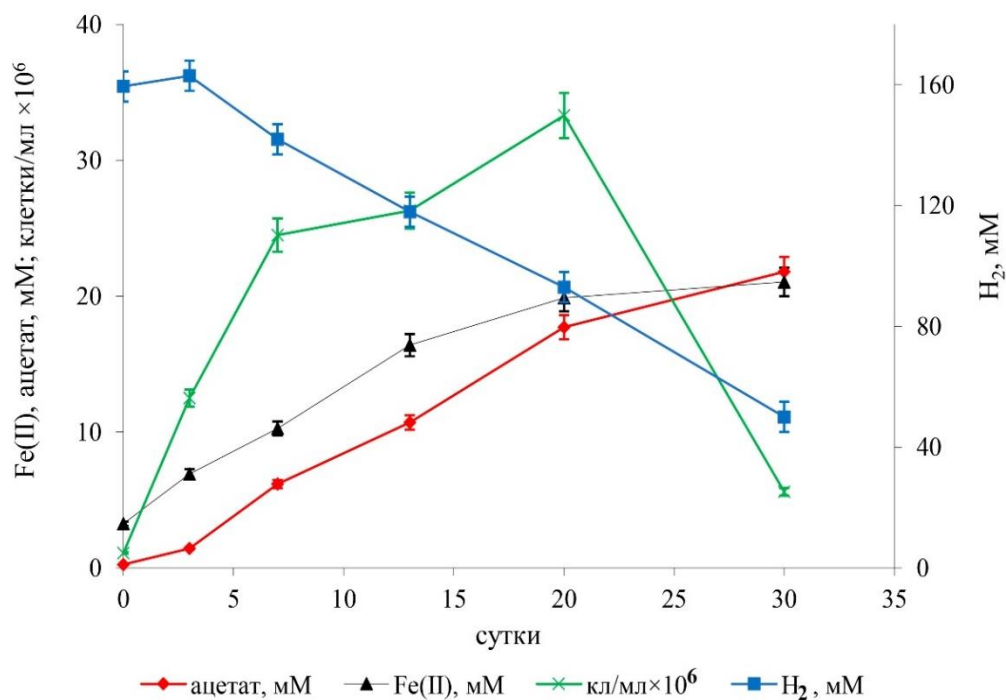


Рисунок 11. Одновременное восстановление железа и карбоната штаммом Z-7101 с молекулярным водородом, сопровождаемое продукцией закисного железа и ацетата.

Интересно, что несмотря на то, что энергетически диссимиляционная железоредукция, выгоднее, чем гидрогенотрофный ацетогенез, оба процесса начались одновременно (Рис.11). Соотношение конечного количества окисленного молекулярного водорода, произведенного Fe²⁺ и ацетата соответствовало следующей суммарной реакции гидрогенотрофных железоредукции и гомоацетогенеза:



Хемотаксономические характеристики. В жирнокислотном профиле клеток штамма Z-7100^T доминировали C_{14:0}, антеизо-C₁₅ и C_{16:0}. Основными альдегидами являлись C₁₆, антеизо-C₁₅ и C₁₄. Содержание G+C в ДНК составляло 32.0%. Доминирующими жирными кислотами в клетках штамма Z-7101^T были антеизо-C_{15:0}, C_{14:0} и C_{16:0}. Основными альдегидами являлись C_{16:0}, антеизо-C_{15:0} и C_{16:1ω7a}.

Филогенетический анализ. Сравнение 1486 п.н. гена 16S рРНК с базой данных GenBank выявило, что штамм Z-7100^T входит в семейство *Halobacteroidaceae*. Среди валидных видов с достоверно опубликованными названиями самый высокий уровень сходства последовательности гена 16S рРНК (92.9 %) был выявлен с *Selenihalanaerobacter shriftii* штамм DSSe-1^T - типовым вида рода *Selenihalanaerobacter*. Сходство последовательностей с другими видами этого рода находилось в диапазоне 85.9-89.7 %. Сходство последовательностей с другими членами семейства *Halobacteroidaceae* не превышало 92.9 %, что соответствовало межродовому уровню внутри этого семейства (85.4-95.0 %). На основании результатов филогенетического анализа и исследования физиологических свойств, мы предложили отнести штамм Z-7100^T к новому роду *Fuchsiella*, названного в честь профессора Георга Фукса (Фрайбург, Германия), который внес большой вклад в понимание путей ассимиляции CO₂ микроорганизмами, с типовым видом *Fuchsiella alkaliacetigena* gen. nov., sp. nov.. Сравнение 1499 п.н. гена 16S рРНК с базой данных GenBank выявило самый высокий уровень сходства 98.9% со штаммом Z-7100^T *Fuchsiella alkaliacetigena*. Проведенная ДНК-ДНК гибридизация между штаммом Z-7101^T и *F. alkaliacetigena* Z-7100^T составила 63.0 %. Таким образом, на основании результатов филогенетического анализа и исследования физиологических свойств, мы предложили отнести штамм Z-7101^T к новому виду этого рода с названием *Fuchsiella ferrireducens* sp.nov.

Типовой и единственный штамм *Fuchsiella alkaliacetigena* Z-7100^T депонирован в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) под номером DSM 24880 и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером VKM В-2667. Типовой штамм *Fuchsiella ferrireducens* Z-7100^T депонирован в DSMZ под номером DSM 26031 и во VKM под номером VKM В-2766.

Распространенность в природе. К сожалению, имеющихся на сегодняшний день в базе данных филотипов, относящихся к роду *Fuchsiella* совершенно недостаточно для того, чтобы оценить распространенность этих бактерий в природе. Помимо содовых озер филотипы этого рода были обнаружены в микробном консорциуме, осуществляющим анаэробную биокоррозию в скважине, вскрывающей водоносный горизонт, содержащий термальные соленые воды (рН 6.0) на севере Германии (Lerm et al., 2013).

Выделенные первые литоавтотрофные алкалофильные железоредукторы филогенетически удалены друг от друга, но физиологически имеют много общих черт (Табл.3). Все они являются мезофильными истинными алкалофилами с оптимумом роста при значениях рН ≥ 8.5 . Помимо хемолитоавтотрофного роста способны хемоорганотрофно

окислять ацетат, другие органические кислоты и этанол и не способны к брожению. Помимо ферригидрита, все выделенные диссимиляционные железоредукторы способны использовать в качестве акцептора электронов элементную серу.

Таблица 3. Главные фенотипические и таксономические характеристики новых диссимиляционных алкалофильных железоредукторов.

Характеристики	<i>Geoalkalibacter ferrihydriticus</i>	<i>Dethiobacter alkaliphilus</i>		<i>Fuchsiella alkaliacetigena</i>	<i>Fuchsiella ferrireducens</i>
	Z-0531 ^T	АНТ1 ^T	Z-1002	Z-7100 ^T	Z-7101 ^T
рН пределы (оптимум)	7.8–10.0 (8.6)	8.5–10.3 (9.5)*	7.8–10.1 (9.2)	8.5–10.7 (8.8-9.3)	8.2–10.2 (9.8)
NaCl пределы (оптимум), г/л	0-50 (0)	0-нд (нд)*	0-150 (50-60)	0-140 (85)	10-160 (70)
облигатная зависимость от карбонатов	-	+*	+	+	+
автотрофия	+	+*	+	+	+
доноры					
H ₂ или формат	+	+*	+	+	+
ацетат	+	+*	+	+	+
этанол	+	+*	+	+	+
органические кислоты	+	+*	+	+	+
сахара	-	+*	-	-	-
акцепторы					
СФ	+	+	+	+	+
S ⁰	+	+*	+	+	+
S ₂ O ₃ ²⁻	-	+*	+	+/-	+/-
SO ₄ ²⁻	-	-*	-	-	-
филум NCBI	<i>Proteobacteria</i>	<i>Firmicutes</i>		<i>Firmicutes</i>	
семейство NCBI	<i>Geobacteraceae</i>	<i>Syntrophomonadaceae</i>		<i>Halanaerobiaceae</i>	
филум GTDB	<i>Desulfobacterota</i>	<i>Bacillota</i>		-	
семейство GTDB	<i>Geobacteraceae</i>	<i>Dethiobacteraceae</i>		-	

*Sorokin et al., 2008

3.3. Новые органогетеротрофные алкалофильные железоредукторы

3.3.1. *Natronincola ferrireducens* sp. nov. Z-0511^T, *Natronincola peptidovorans* sp. nov., Z-7031^T

Источники выделения. Штамм Z-0511^T был получен из той же накопительной культуры, что и *Geoalkalibacter ferrihydriticus* штамм Z-0531^T (раздел 3.2.1.), выделением капиллярным методом колоний, выращенных на агаризованной среде в ролл-тюбах, содержащей AQDS (20 мМ) и дрожжевой экстракт (3 г/л) в качестве акцептора и донора электронов.

Штамм Z-7031^T был выделен Т.Н. Жилиной из целлюлозо-разлагающего микробного сообщества, полученного из донных осадков озера Верхнее Белое (рН 10.2, минерализация 24 г/л), развивающегося на микрокристаллической целлюлозе с добавлением дрожжевого экстракта (0.2 г/л). После нагревания при 90° С в течение 20 мин в накопительной культуре осталось несколько форм спорообразующих палочек, одна из которых была выделена из колоний, выращенных на агаризованной среде с пептоном (3 г/л) капиллярным методом.

Морфология клеток. Клетки штаммов Z-7031^T и Z-0511^T имели сходную морфологию и представляли собой подвижные тонкие прямые или слегка изогнутые палочки, 1.5–4.0 мкм в длину и 0.2–0.5 мкм в диаметре (Рис.12). Характерным являлось расположение клеток под углом друг к другу и в виде палисадов. На поздних стадиях развития штамма Z-7031 образовывались длинные (до 10–20 мкм) клетки с терминальными сферическими спорами (0.5 мкм в диаметре). Подвижность клеток штамма Z-7031^T обеспечивалась одним или двумя боковыми жгутиками (Рис.12б). В случае штамма Z-0511^T, клетки были подвижными, хотя жгутики не были обнаружены. Структура клеточной стенки обоих штаммов относилась к грамположительному типу. Штамм Z-7031^T образовывал белые дисковидные колонии (0.1–1.0 мм в диаметре) с асимметрично вытянутым краем и мелкозернистой муаровой поверхностью (Рис.12в). Колонии штамм Z-0511^T были дисковидными светло-бежевыми (0.2–0.4 мм в диаметре) с ровными краями.

Физиологические характеристики. Штаммы были облигатными алкалофилами и росли в диапазоне рН 7.5–10.2 с оптимумом при рН 8.4–8.8 для штамма Z-7031^T и выраженным оптимумом при рН 8.4 для штамма Z-0511^T. Температурный диапазон роста составлял 15–40°С, с оптимум при Т 35–37°С. Организмы являлись галотолерантами и не нуждались в NaCl. Штамм Z-0511^T рос при концентрации NaCl до 60 г/л с оптимумом при 5–7 г/л; штамм Z-7031^T - при концентрации NaCl до 70 г/л с оптимумом при 10–25 г/л. Штаммы не проявляли облигатной потребности в карбонатных ионах, которые могли быть заменены органическими

буферами Tris или CAPS для поддержания pH. При этом оптимальные концентрации $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ для штаммов Z-7031^T и Z-0511^T составляли 6.0/20.0 и 3.0/10.0 г/л, соответственно. Оба штамма оказались аэротолерантными, способными расти при в присутствии не более 0.2% (об/об) O_2 , хотя не были способны к использованию его в качестве акцептора электронов. Хотя оба штамма могли расти в отсутствие восстановителей, добавление сульфида или цистеина существенно стимулировало их рост.

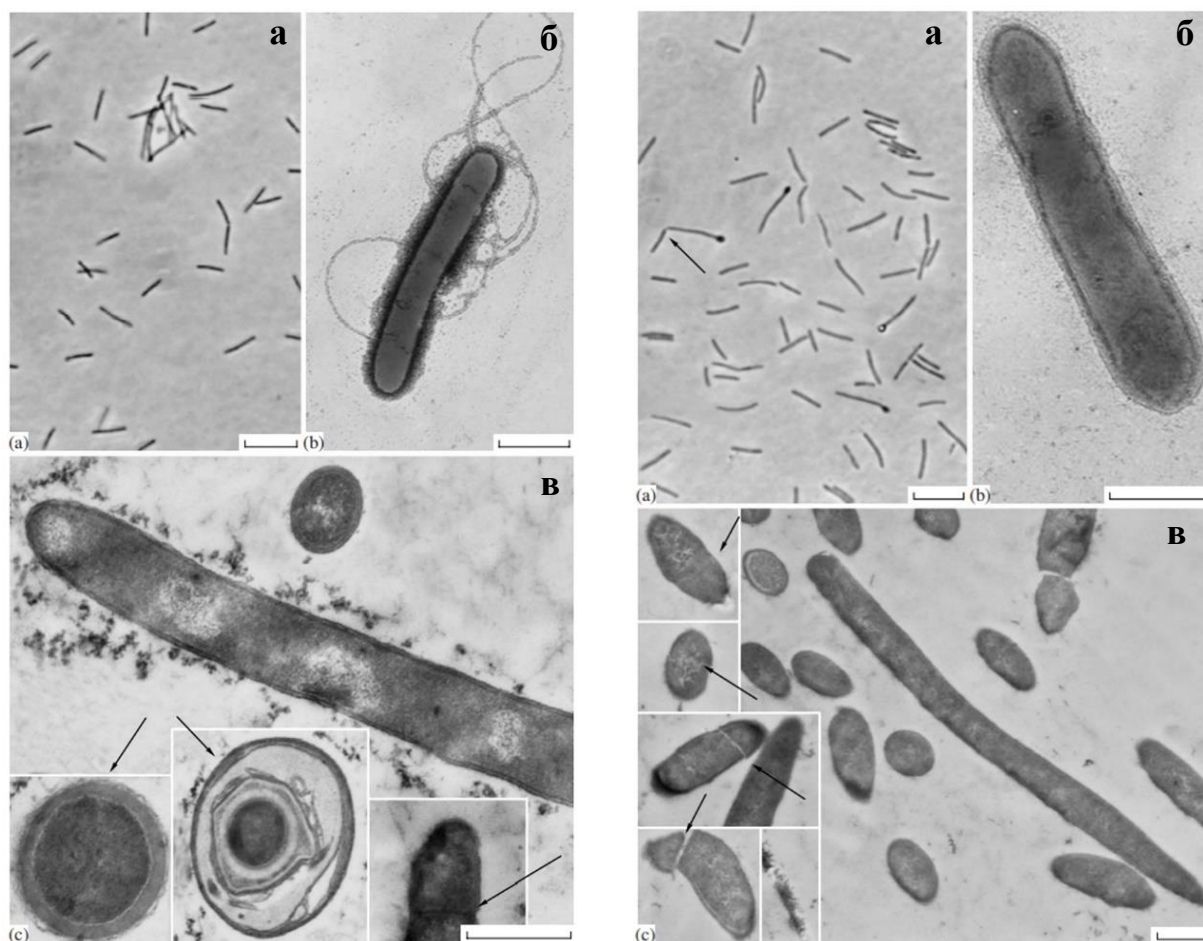


Рисунок 12. Морфология клеток штаммов Z-0531^T (слева) и Z-0511^T (справа). Световая микроскопия (а): вегетативные клетки и клетки со спорами; масштабная линейка, 10 мкм. Электронная микроскопия (б, в): клетка в плотной капсуле; масштабная линейка 0.5 мкм (б); продольный ультратонкий срез клетки со структурой клеточной стенки типичной для грамположительных бактерий (в). Стрелками указаны споры на разных стадиях развития и септации клеток.

По типу метаболизма оба штамма являлись хемоорганогетеротрофами -пептолитиками с довольно узким спектром используемых субстратов - дрожжевой экстракт, триптиказа, сойтон, триптон, мясной экстракт, пептон и казаминовые кислоты. Кроме того, штамм Z-7031^T использовал пируват, тогда как штамм Z-0511^T рос с гистидином и, в слабой степени,

глутаматом. Лучший рост был отмечен на дрожжевом экстракте, в то время как скорость утилизации пептона была низкой. Во время роста на отдельных аминокислотах, требовалось добавление витаминов или дрожжевого экстракта (50 мг/л). Органические кислоты, спирты, аминокислоты, а также биомасса *Euhalotheca*, *Microcoleus*, *Spirulina* или гаприн не использовались бактериями в качестве субстратов. Ацетат и формиат (1:1) были основными продуктами, образующимися в процессе сбраживания дрожжевого экстракта штаммом Z-7031^T, в то время как штамм Z-0511^T в аналогичных условиях продуцировал ацетат и пропионат.

С дрожжевым экстрактом в качестве донора электронов оба штамма оказались способны восстанавливать окисное железо в виде ферригидрита или в комплексе с ЭДТА, равно как и AQDS и MnO₂. Кроме того, штамм Z-0511^T использовал фумарат и кротонат в качестве акцепторов электронов: из 5 мМ фумарата образовались 4.6 мМ сукцината и 6.4 мМ ацетата; из 10 мМ кротоната и дрожжевого экстракта – 1.8 мМ бутирата и 11.6 мМ ацетата. Соединения серы и азота не использовались обоими штаммами. Добавление 90 мМ СФ в присутствии 0.3 г/л цистеина приводило к удвоению клеточной биомассы, в случае штамма Z-7031^T, или утроению, в случае штамма Z-0511^T.

Хемотаксономические характеристики. Оба штамма имели сходный жирнокислотный профиль. В их клеточной стенке доминировали C_{16:1ω7c}, C_{16:0}, C_{18:1ω9}, C_{14:0} и C_{18:0} составляя соответственно 70.5 и 72.5% от общего профиля жирных кислот штаммов Z-7031^T и Z-0511^T. Содержание G+C в ДНК составляло штаммов Z-7031^T и Z-0511^T 35.5% и 35.3%.

Филогенетический анализ. Оба штамма занимали отдельные ветви в подгруппе *Clostridium felsineum* кластера XI семейства *Clostridiaceae*; уровни сходства между их последовательностями генов 16S рРНК и последовательностями гена 16S рРНК ближайших видов не превышали 95%, что подтверждало принадлежность штаммов Z-7031^T и Z-0511^T к новым видам. Уровни сходства между последовательностями генов 16S рРНК штаммов Z-7031^T и Z-0511^T и *C. felsineum*, *C. formicoaceticum* и *Natronincola histidinovorans* были практически одинаковыми (93.2–94.8%, 93.7–95.1%, и 92.2–94.1%, соответственно). Таким образом, на основании результатов филогенетического анализа и исследования физиологических свойств, мы предложили отнести штамм Z-7031^T и Z-0511^T к двум новым видам рода *Natronincola* и предложить для них названия *Natronincola ferrireducens* sp. nov. Z-0511^T, *Natronincola peptidovorans* sp. nov., Z-7031^T.

Типовые штаммы *Natronincola peptidovorans* Z-7031^T и *Natronincola ferrireducens* Z-0511^T депонированы в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) и во Всероссийской

коллекции микроорганизмов под номерами Z-0511^T (= DSM 18346; = VKM B-2402,) и Z-7031^T (= DSM 18979; = VKM B-2503).

Распространенность в природе. Большинство филотипов, находящихся в базе данных GenBank и относящихся к роду *Natronincola*, детектировано в пробах содовых озер или щелочных засоленных почв, а также биореакторах и электрогенных микробных сообществах (Рис.13). Согласно проведенному анализу, можно сделать вывод, что бактерии этого рода в природе тесно ассоциированы с поверхностными щелочными местообитаниями. Существенная часть филотипов, ассоциированная с электрогенными микробными сообществами, позволяет предполагать, что выявленная способность к железоредукции и наличие мультигемовых цитохромов, возможно, позволяет бактериям этого рода использовать механизм прямого переноса электрона на анод.

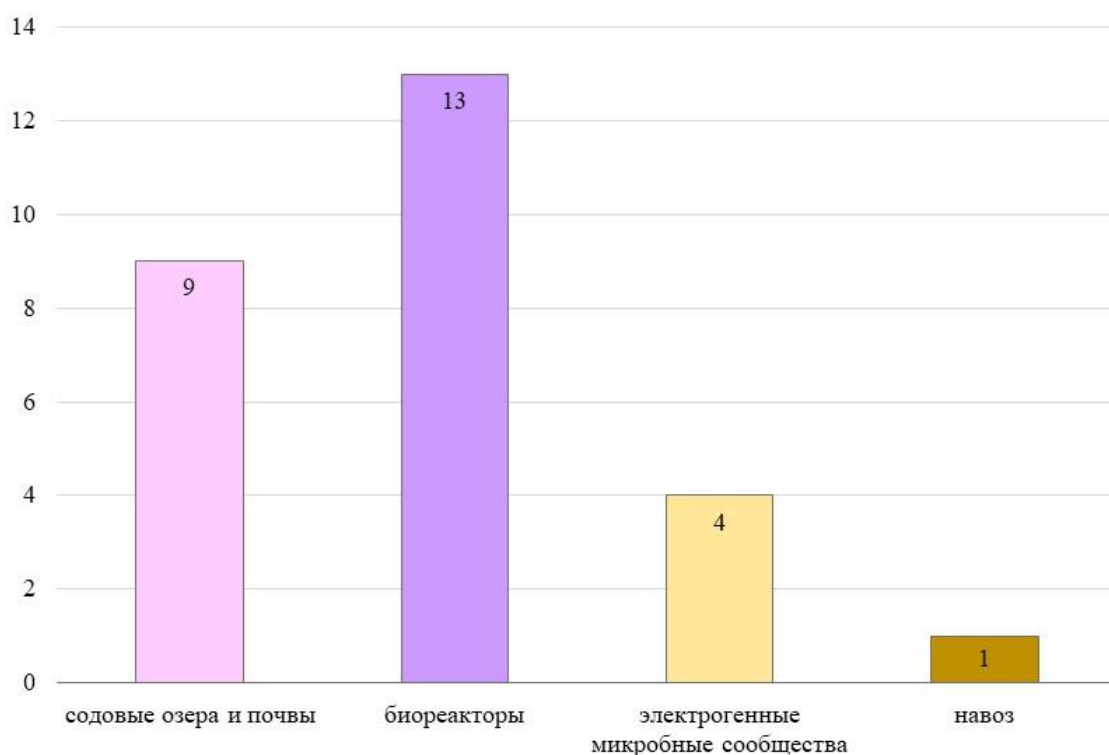


Рисунок 13. Оценка распространенности в природных и антропогенных экосистемах филотипов, относящихся к роду *Natronincola*, проведенная на основе анализа базы данных GenBank.

3.3.2. *Alkaliphilus peptidifermentans* sp. nov. Z-7036^T

Источник выделения. Штамм Z-7036^T был выделен Т.Н. Жилиной из той же накопительной культуры анаэробного целлюлозо-разлагающего микробного сообщества, что и штамм Z-7031^T. После серии десятикратных разведений на среде, содержащей дрожжевой экстракт (2.0 г/л) и пептон (2.0 г/л) культура была посеяна на агаризованную среду в ролл-тюбах. Единичные колонии были выделены капиллярным методом.

Морфология клеток. На стадии экспоненциального роста клетки штамма Z-7036^T представляли собой тонкие короткие палочки, расположенные одиночно или попарно, 1.15-3.0 мкм в длину и 0.25-0.4 мкм в диаметре (Рис.14). На полюсах клеток или в процессе деления в середине делящихся клеток наблюдалось образование миниклеток. Клетки обладали слабой подвижностью, однако, жгутиков обнаружить не удалось (Рис.14б). На поздних стадиях роста клетки располагались в цепочках до двадцати клеток, сильно удлинялись и образовывали сферические терминальные споры. Структура клеточной стенки штамма Z-7036^T относилась к грамположительному типу (Рис.14в).

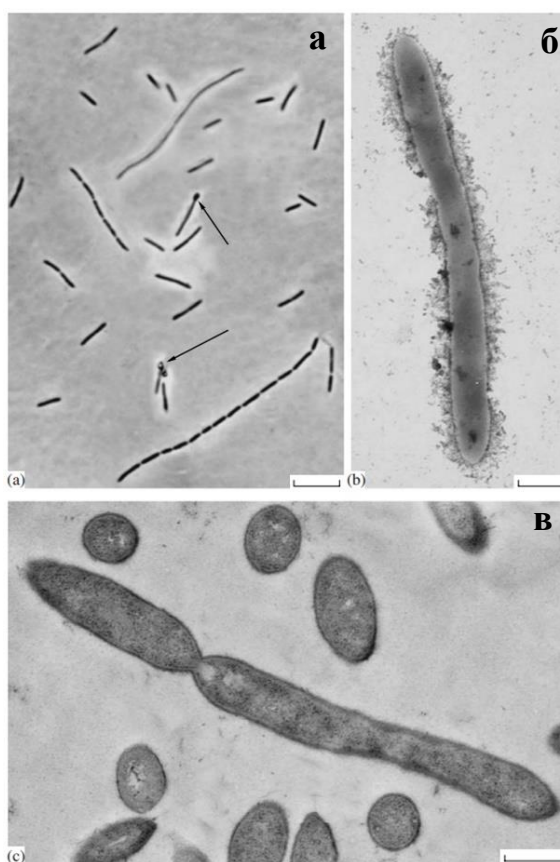


Рисунок 14. Морфология клеток штаммов Z-0536^T. Световая микроскопия (а): вегетативные клетки и клетки со спорами; масштабная линейка, 10 мкм. Электронная микроскопия (б, в), демонстрирующая продольный ультратонкий срез клетки со структурой клеточной стенки типичной для грамположительных бактерий (в); масштабная линейка 0.5 мкм.

Физиологические характеристики. Штамм Z-7036^T являлся облигатным алкалофилом, растущим в диапазоне значений pH 7.5-9.7 с оптимумом при pH 9.1 и мезофилом, растущим в широком диапазоне температур 6-40 °C с оптимумом 35 °C. Изолят являлся аэротолерантным анаэробом, не способным к использованию кислорода в качестве акцептора электронов, но выдерживающим его в концентрации не выше 1.5% (об.) в газовой

фазе. Был способен к росту в отсутствии восстановителей, хотя добавление цистеина, тиогликолята или сульфида (0.3–0.5 г/л) приводило к уменьшению продолжительности лаг-фазы. Организм был галотолерантом, не нуждался в NaCl, но рос при концентрации NaCl до 50 г/л с оптимумом при 20 г/л. Штамм Z-7036^T являлся облигатным натронофилом, не способным к росту в отсутствии карбонатов, которые не могли быть заменены органическими буферами для поддержания pH. Область роста по концентрации Na₂CO₃/NaHCO₃ составляла 1.5–3.0/5.0–10.0 г/л.

По типу метаболизма штамм Z-7036^T являлся хемоорганогетеротрофом, использующим такие органические соединения как пептон, дрожжевой экстракт, триптиказа, триптон, Vasto Soytone, мясной экстракт, казаминовые кислоты, орнитин, аргинин и, в меньшей степени, треонин, триптофан и пируват. Не способен сбраживать казеин или альбумин, не растворял желатин, хотя демонстрировал слабый рост на нем. Ацетат и формиат, продуцируемые в равных долях, были основными продуктами брожения. Не использовал органические кислоты, спирты, сахара, сахароспирты и аминокислоты.

В процессе изучения была обнаружена способность исследуемого штамма утилизировать мертвую биомассу - коммерческие препараты "Гаприн" (высушенная биомасса *Methylococcus*) и "Спирулина" в качестве единственных источников энергии. Количество основных метаболитов, произведенных во время роста на "Гаприне" и "Спирулине", а также их состав были сопоставимы с теми, которые были получены при выращивании на дрожжевом экстракте. Во время роста штамма Z-7036^T на "Гаприне" и "Спирулине", клетки метилококка и спирулины лизировались. Штамм Z-7036^T не рос на стерилизованной клеточной биомассе "*Euhalothecca*", *Microcoleus* и *Clostridium alkalicellulosi*, что указывало на необходимость более глубокой обработки субстрата, достигаемой паровой сушкой коммерческих препаратов "Гаприн" и "Спирулина", по сравнению с автоклавированием. С дрожжевым экстрактом в качестве донора электронов бактерия не использовала соединения азота и серы, за исключением слабого восстановления тиосульфата, а также не была способна восстанавливать Mn(IV). Штамм Z-7036^T восстанавливал СФ, с образованием в качестве восстановленных минералов смесь магнетита и сидерита, а также Fe(III)-ЭДТА (20 мМ), AQDS (20 мМ), фумарат (5 мМ) и кротонат (10 мМ).

Штамм Z-7036^T не был чувствителен к добавлению 100 мг/л ампициллина, рифампицина, канамицина, хлорамфеникола, пенициллина, неомицина или новобиоцина, тогда как стрептомицин, ванкомицин и бацитрацин в тех же концентрациях полностью подавляли его рост.

Хемотаксономические характеристики. В жирнокислотном профиле штамма Z-7036^T доминировали iso-C₁₅, C_{16:1ω7c}, C_{16:0}, iso-C_{17:1}, iso-C₁₇ кислоты. Содержание G+C в ДНК составляло 33.8%.

Филогенетический анализ. Согласно филогенетическому анализу последовательностей генов 16S рРНК, штамм Z-7036^T кластеризовался со штаммами рода *Alkaliphilus* в кластере XI грамположительных бактерий с низким содержанием G+C семейства *Clostridiaceae*. В этом кластере новый штамм образовал отдельную ветвь. Уровень сходства с ближайшими видами рода *Alkaliphilus* составил 93.9–94.2%, что подтверждает принадлежность штамма Z-7036^T к новому виду рода *Alkaliphilus*. Среди членов этого кластера, "*A. metalliredigens*" (сходство 94.2%) и два валидно опубликованных вида, *A. transvaalensis* (93.3%) и *A. crotonatoxidans* (93.9% сходство) имели самый высокий уровень сходства с новым штаммом. На основании результатов филогенетического анализа и исследования физиологических свойств, мы предложили отнести штамм Z-7036^T к новому виду рода *Alkaliphilus* и предложить для него название *Alkaliphilus peptidifermentans* sp. nov..

Типовой штамм *Alkaliphilus peptidifermentans* Z-7036^T депонирован в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номерами Z-7036^T (= DSM 18978; = VKM B-2502).

Распространение в природе. Согласно проведенной оценке распространенности представителей рода *Alkaliphilus* на основе анализа базы данных GenBank, фило типы этого рода имеют широкое географическое и экологическое распространение (Рис.15).

Обращает внимание приуроченность бактерий этого рода к щелочным местообитаниям - содовые озера, щелочные почвы, серпентиниты, а также горным породам, содержащим минералы железа. Большое количество фило типов детектировано в антропогенных экосистемах – прежде всего, биореакторах, многие из которых характеризуются повышенными значениями рН ≥ 8.0 , электрогенных биореакторах и биопленках. Довольно много фило типов обнаружено в навозе различных животных. В целом можно сказать, что представители этого рода явно тяготеют к щелочным условиям и связаны с преобразованием железосодержащих минералов. Интересно, что фило типы этого рода не детектируются в экосистемах, связанных с нефтепроявлениями.

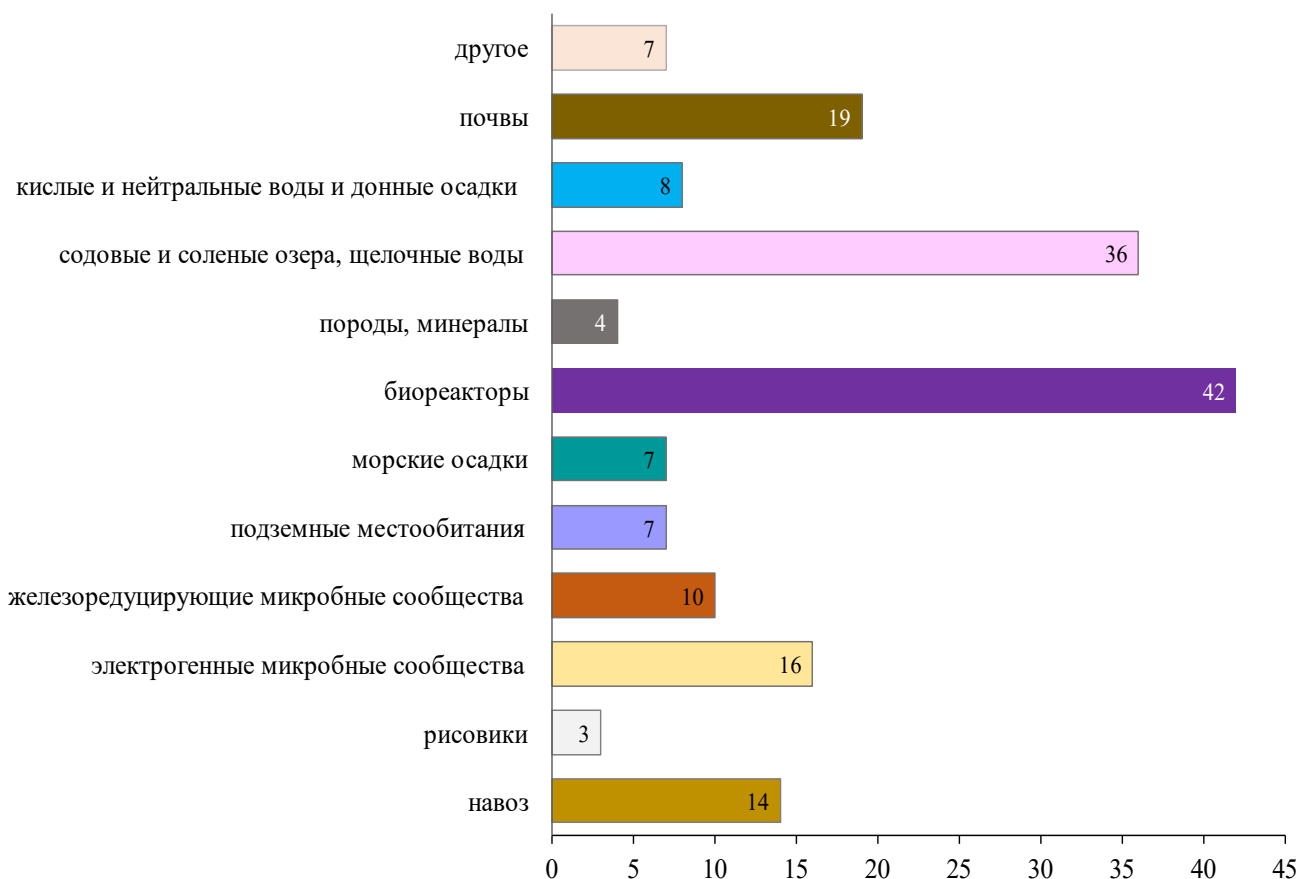


Рисунок 15. Оценка распространенности в природных и антропогенных экосистемах филотипов, относящихся к роду *Alkaliphilus*, проведенная на основе анализа базы данных GenBank.

3.3.3. *Isachenkonina alkalipeptolytica* gen. nov., sp. nov. Z-1701^T

Источник выделения. Штамм Z-1701^T был выделен как олиготрофный спутник литоавтотрофной железовосстанавливающей бактерии из донных осадков содового озера Танатар III (Алтай, Российская Федерация; pH 10.35; минерализация, 108 г/л), отобранных В.В. Кевбриным в июне 2007 г. Его присутствие было обнаружено после посева на среду с дрожжевым экстрактом культуры формиат-использующего железоредуктора с целью проверки его чистоты. После серии десятикратных разведений на среде, содержащей дрожжевой экстракт (2.0 г/л) культура была посеяна на агаризованную среду в ролл-тюбах. Единичные колонии были выделены в жидкую среду капиллярным методом.

Морфология клеток. Клетки штамма Z-1701^T представляли собой короткие неспорообразующие палочки толщиной 0.3–0.5 мкм и длиной 1.5–2.5 мкм (Рис.16а). Подвижность клеток обеспечивали один или два субтерминальных жгутика (Рис.16б). Строение клеточной стенки относилось к грамположительному типу, что видно на препаратах ультратонких срезов (Рис.16в).

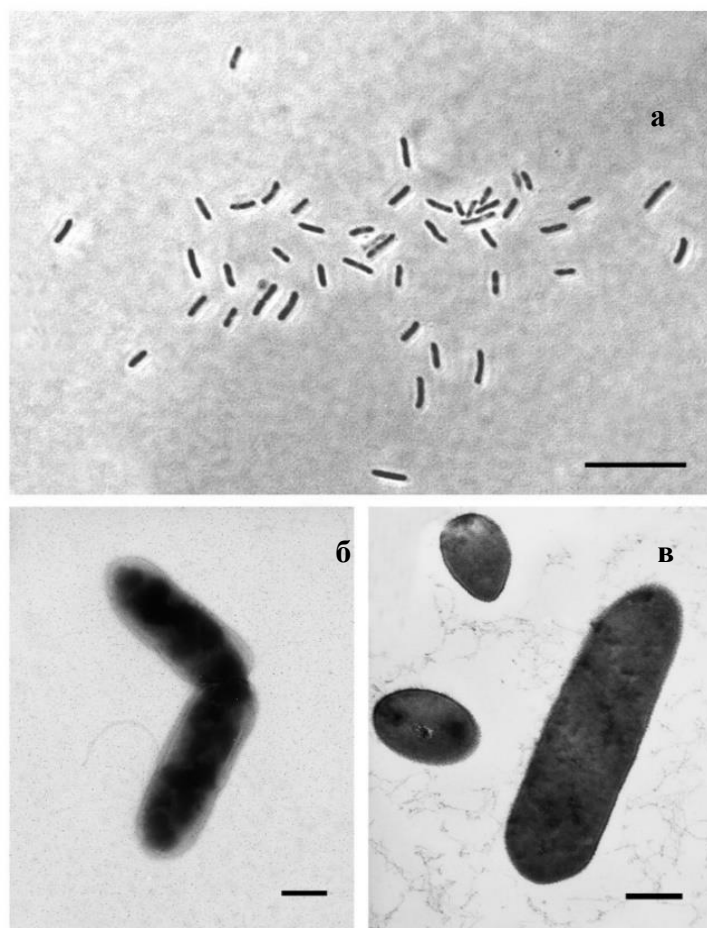


Рисунок 16. Морфология клеток штаммов Z-1701^T. Световая микроскопия (а): вегетативные клетки; масштабная линейка, 5 мкм. Электронная микроскопия (б, в), демонстрирующая боковое прикрепление жгутиков (б) и продольный ультратонкий срез клетки со структурой клеточной стенки типичной для грамположительных бактерий (в); масштабная линейка 0.2 мкм.

Физиологические характеристики. Штамм Z-1701^T являлся облигатным алкалофилом, растущим в диапазоне значений рН 7.5–10.2 с оптимумом при рН 9.0-9.3 и мезофилом, растущим в широком диапазоне температур 10-43 °С с оптимумом 35 °С. Изолят являлся облигатным анаэробом, не способным к росту в присутствии кислорода, но развивающимся без добавления в среду восстановителей (сульфида). Организм не нуждался в присутствии NaCl и являлся, таким образом, галотолерантом, но был облигатным натронофилом, т. к. не был способным к росту в отсутствии карбонатов. Пределы роста по концентрации карбонатов составляли 1.5–2.9 с оптимальным ростом при концентрации карбонатов 2.1 М.

Штамм Z-1701^T использовал желатин, альбумин и казеинат натрия или смеси пептидов, такие как дрожжевой экстракт, мясной экстракт, пептон, триптон, сойтон, в качестве единственных источников углерода, азота и энергии. Сухая биомасса спирулины и «Гаприн», а также сахара, казामीновые кислоты и отдельные аминокислоты не использовались

бактерией, за исключением слабого роста на аспарагине или аргинине. Продуктами сбраживания дрожжевого экстракта являлись ацетат, формиат и аммоний. Штамм Z-1001^T был способен олиготрофно расти с дрожжевым экстрактом в концентрациях 0.02–0.05 г/л с урожайностью 9.6×10^5 – 1.4×10^6 клеток/мл. Максимальная урожайность и скорость роста наблюдалась при концентрации дрожжевого экстракта 2.5–3.0 г/л.

Штамм Z-1701^T оказался хемоорганотрофом, способным окислять все вышеперечисленные субстраты, восстанавливая СФ, причем присутствие минерала в среде стимулировало скорость роста и продукцию биомассы штаммом Z-1701^T. Органические кислоты и водород не использовались в качестве доноров электронов. Помимо СФ, бактерия восстанавливала AQDS (2 мМ) и комплекс Fe(III)-ЭДТА (20 мМ), а также элементную серу, и в слабой степени тиосульфат (20 мМ). Сульфат (20 мМ), сульфит (20 мМ), нитрат (20 мМ), нитрит (10 мМ), кротонат (10 мМ) и фумарат (20 мМ) не восстанавливались штаммом Z-1701^T.

Хемотаксономические характеристики. В жирнокислотном профиле штамма Z-1701^T доминировали изо-C_{15:0}, iso-C_{15:0} альдегид, iso-C_{15:1}ω6, C_{16:0}, iso-C_{17:0} альдегид, C_{16:0} альдегид, C_{14:0}, C_{18:0}, iso-C_{13:0}, и iso-C_{17:1}ω8 альдегид.

Содержание G+C в ДНК рассчитанное *in silico* составляло 43.9%.

Филогенетический анализ. Согласно филогенетическому анализу, штамм Z-1701^T представляет собой отдельную ветвь уровня рода, расположенную в кластере с представителями семейств *Clostridiaceae* и *Peptostreptococcaceae*. Согласно филогенетическому анализу на основе мультибелковых последовательностей, эта ветвь также включает два вида рода *Tindallia*. Следует отметить, что среди представителей семейства *Clostridiaceae*, близких к штамму Z-1701^T, большинство являются алкалофильными или алкалотолерантными железоредуцирующими бактериями, тогда как большинство близкородственных представителей *Peptostreptococcaceae* - нейтрофильные бактерии, не способные к восстановлению железа. Скорее всего, общий предок *Clostridiaceae* и штамма Z-1701^T был мезофильным щелочным алкалофилом, способный к железоредукции, однако эти способности были впоследствии утрачены в нескольких линиях *Clostridiaceae* в ходе эволюции. На основании филогенетического анализа, результатов хемотаксономии и фенотипических различий между штаммом Z-1701^T и валидными представителями семейств *Clostridiaceae* и *Peptostreptococcaceae*, мы отнесли штамм Z-1701^T к новому роду и виду и предложили для него название *Isachenkonkia alkalipeptolytica* gen. nov., sp. nov. в честь выдающегося русского микробиолога Бориса Львовича Исаченко (1871–1948), который одним из первых в мире начал исследовать микробные сообщества содовых озер.

Типовой штамм *Isachenkonkia alkalipeptolytica* Z-1701^T депонирован в Японской коллекции микроорганизмов (Japan Collection of Microorganisms) и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номерами Z-1701^T (=JCM 32929, =VKM В-3261).

Все выделенные в чистые культуры новые органотрофные алкалофильные железоредукторы и филогенетически, и фенотипически близки друг другу: все они являются представителями семейства *Clostridiaceae*, мезофильными галотолерантными алкалофилами с широкими пределами роста по pH и оптимумом роста при значениях pH ≥ 8.4 (Табл.4).

Таблица 4. Главные фенотипические и таксономические характеристики новых диссимиляционных алкалофильных железоредукторов.

Характеристики	<i>Natronincola peptidovorans</i>	<i>Natronincola ferrireducens</i>	<i>Alkaliphilus peptidifermentans</i>	<i>Isachenkonkia alkalipeptolytica</i>
	Z-7031 ^T	Z-0511 ^T	Z-7036 ^T	Z-1701 ^T
pH пределы (оптимум)	7.5-10.2 (8.4-8.8)	7.5-10.2 (8.4)	7.5-9.7 (9.1)	7.5-10.2 (9.0-9.3)
облигатная зависимость от карбонатов	-	-	+	+
облигатная зависимость от хлоридов	-	-	-	-
сбраживание сахаров	-	-	-	-
рост при 1.5% O ₂	+	+	+	-
сбраживание пептидов	+	+	+	+
разложение мортмассы	-	-	+	-
доноры				
акцепторы				
СФ	+	+	+	+
Fe(III)-ЭДТА	+	+	+	+
AQDS	+	+	+	+
Mn(IV)	+	+	-	-
S ⁰	-	-	-	+
S ₂ O ₃ ²⁻	-	-	-	+/-
фумарат	-	+	+	-
кротонат	-	+	+	-
филум NCBI	<i>Bacillota</i>			
семейство NCBI	<i>Clostridiaceae</i>			
филум GTDB	<i>Firmicutes</i>			

Все выделенные бактерии оказались пептолитиками, не способными к сбраживанию сахаров или аминокислот. Все были способны к восстановлению железа в растворимой и нерастворимой форме, а также AQDS. Интересно, что аэротолерантные виды, способные выдерживать концентрацию кислорода 1.5–2% не были способны к восстановлению серных соединений в то время, как облигатно анаэробная бактерия *I. alkalipeptolytica* восстанавливала серу и в слабой степени тиосульфат.

3.4. Прямое восстановление Fe(III) из синтезированного ферригидрита галоалкалофильными литотрофными сульфидогенами

Биогеохимические циклы железа и серы тесно связаны друг с другом, прежде всего за счет образования сульфидов железа. С момента описания процесса диссимиляционной железоредукции было проведено немало исследований, направленных на выяснение взаимодействия сульфатредукторов и железоредукторов в анаэробных осадках. В частности, было установлено, что поскольку процесс железоредукции является одним из наиболее энергетически выгодных, железоредукторы выигрывают конкуренцию за углеродный субстрат у сульфатредукторов, даже с учётом того, что чаще всего окисное железо представлено в нерастворимом виде (Roden, 2008). Кроме того, было показано, что ферригидрит ингибирует микробную сульфатредукцию в осадках, в частности, из-за повышения ОВ-потенциала среды при связывании железа с сульфидом (Lovley and Phillips, 1987), но за счет этого же свойства способствует процессам диспропорционирования серы и тиосульфата (Slobodkin et al., 2012). Некоторые сульфатредукторы способны восстанавливать ферригидрит без стимуляции роста, образуя в качестве восстановленного продукта сидерит (Coleman et al. 1993) или пирротин (Li et al., 2006). Восстановление же нерастворимого железа в качестве энергодающей реакции было показано только для двух сульфатредуцирующих бактерий – *Desulfobulbus propionics* и '*Desulfotomaculum reducens*' (Tebo and Obratsova, 1998; Holmes et al., 2004a). С другой стороны, очень многие микроорганизмы, описанные как железоредукторы, оказались способными к восстановлению элементной серы, в то время как способность к восстановлению сульфата менее распространена среди диссимиляционных железоредукторов (Lovley, 2013).

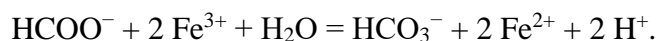
Несмотря на то, что биогеохимический цикл серы играет ведущую роль в осадках современных содовых озер (Sorokin et al., 2011), и в основном сульфидогены ответственны за последние этапы анаэробного разложения органического вещества, проведенные нами исследования показали присутствие в этих местообитаниях диссимиляционных галоалкалофильных железоредукторов, которые, несмотря на способность к восстановлению соединений серы, не утратили альтернативной возможности использования окисного железа

в качестве акцептора электронов. Что касается галоалкалофильных сульфатредукторов, то к началу нашей работы был известен лишь один представитель этой группы - *Desulfonatronum buryatense*, способный использовать железо в качестве акцептора электронов в процессе органотрофного роста (Ryzhmanova et al., 2013). Данные о наличии этой функции у группы литотрофных сульфидогенов отсутствовали.

Нами была протестирована способность к прямому восстановлению окисного железа после трех последовательных пересевов на среде с СФ у семи видов галоалкалофильных литотрофных сульфидогенов с использованием в качестве донора электронов молекулярного водорода или формиата. *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans*, штамм Z-7952^T (Zhilina et al., 1997), *Desulfonatronum lacustre*, штамм Z-7951^T (Пикута и др., 1998), *Desulfonatronum cooperativum*, штамм Z-7999^T (Zhilina et al., 2005b), *Desulfonatronum thiodismutans*, штамм MLF1^T (Pikuta et al., 2003), *Desulfonatronospira delicate*, штамм АНТ6^T (Sorokin et al., 2008a) представляли группу галоалкалофильных гидрогенотрофных сульфатредукторов, *Desulfuribacillus alkaliarsenatis* АНТ28^T (Sorokin et al., 2012) и *Desulfurispira natronophila* АНТ11^T (Sorokin et al., 2010b) представляли группу галоалкалофильных гидрогенотрофных сероредукторов.

3.4.1. Восстановление галоалкалофильными сульфидогенами синтезированного ферригидрита при росте на формиате

К восстановлению СФ на формиате оказались способны все исследованные сульфатредукторы за исключением *Desulfonatronospira delicate*, штамм АНТ6^T (Рис.17а). Наиболее выраженной эта способность оказалась у *Desulfonatronum cooperativum*, штамм Z-7999^T. Характерным для всех исследованных сульфатредукторов явлением было нестехиометрическое окисление формиата. Во всех случаях его потребление в 2-3 раза (Рис.17а) превышало стехиометрическое соотношение с образовавшимся Fe(II) по реакции:



Из исследованных сероредукторов к железоредукции с формиатом оказались способны два из трёх протестированных штаммов. *Desulfurispira natronophila*, штамм АНТ11^T, не восстанавливал Fe(III), у *Desulfuribacillus alkaliarsenatis* при сохраняющейся стабильной численности 5×10^6 кл/мл в последовательных пересевах наблюдалось увеличение количества восстановленного железа, чего не могло бы быть при взаимодействии железа с остатками продукта сероредукции - сульфида. Численность клеток большинства сульфидогенов на среде с СФ и формиатом была на 1.5–2.0 порядка ниже, чем с этим же донором на среде с сульфатом или серой и все они показали схожую стратегию роста на ферригидрите. Фактически, она

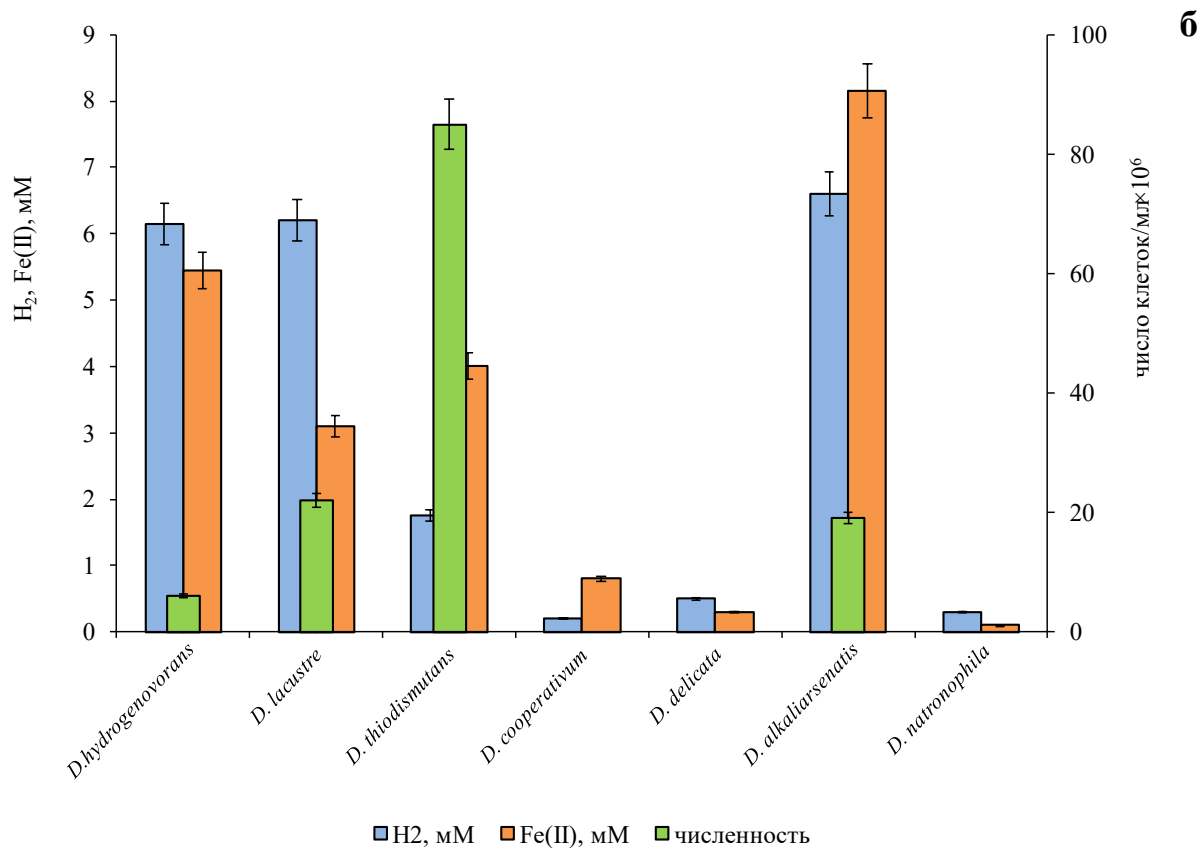
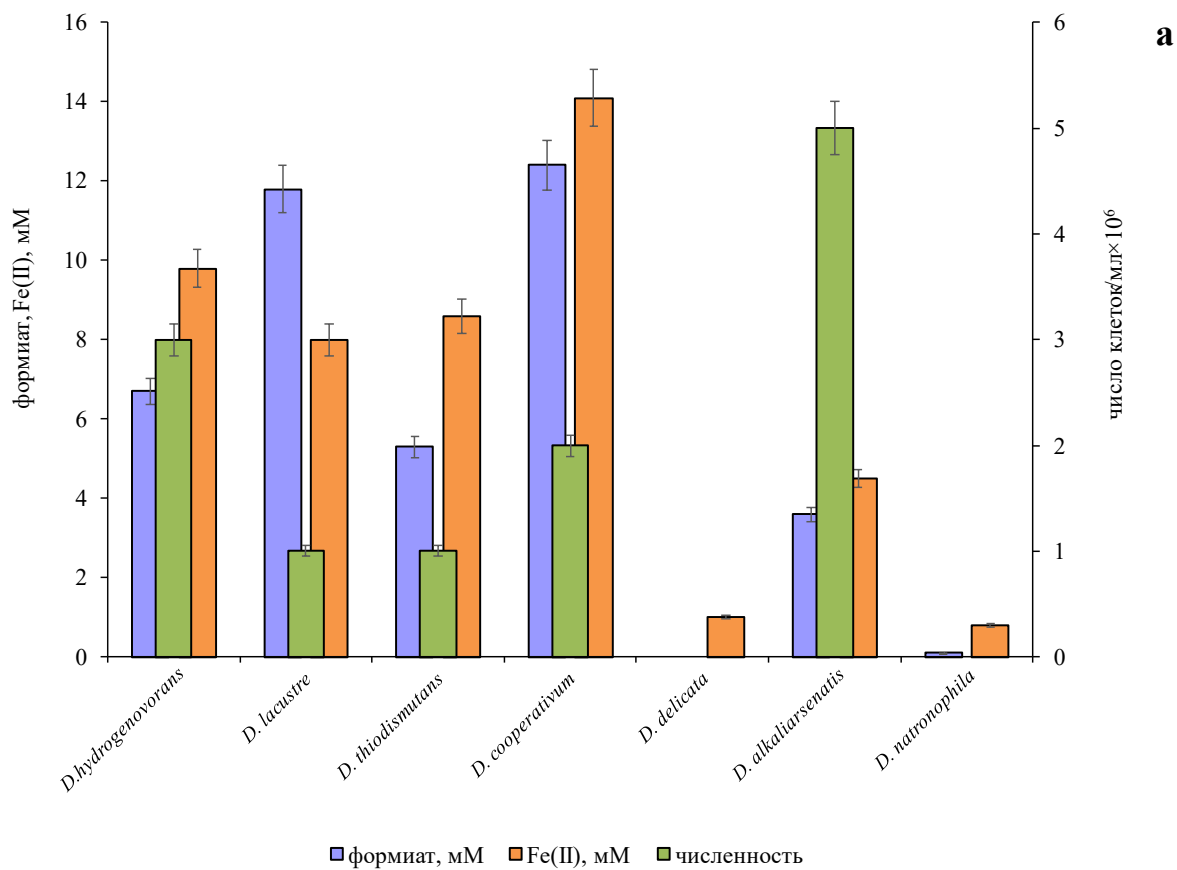


Рисунок 17. Урожай клеток, образование Fe(II) и количество потребленного формиата (а) или водорода (б) при росте гидрогенотрофных алкалофильных сульфидогенов на синтезированном ферригидрите.

заклучалась в поддержании минимальной численности жизнеспособных клеток, которые осуществляли восстановление СФ. При засеке культур, выращенных на СФ, обратно на среду с сульфатом или серой урожай клеток и их морфология полностью восстанавливались.

3.4.2. Восстановление галоалкалофильными сульфидогенами синтезированного ферригидрита при росте на водороде

Результаты исследования роста сульфидогенов на СФ с молекулярным водородом представлены на рисунке 176. Среди сульфатредукторов не способными восстанавливать СФ на водороде оказались *Desulfonatronospira delicata* и *Desulfonatronum cooperativum*. У сероредукторов способность восстанавливать СФ на водороде полностью совпала с данными по формиату. При этом существенно выделялся урожай клеток *Desulfonatronum thiodismutans*, штамм MLF1^T, который достигал 8.5×10^7 кл/мл, против $1.0-2.0 \times 10^6$ кл/мл у остальных сульфидогенов. Интересно, что *Desulfonatronum cooperativum*, устойчиво и наиболее активно восстанавливающий СФ на формиате (Рис.17а), оказался неспособным к его восстановлению с молекулярным водородом (Рис.17б). Как и в случае с формиатом, скорость восстановления СФ значительно уступала скорости восстановления сульфата или серы.

3.4.3. Геномный анализ

На момент проведения работы были доступны геномы 5 протестированных нами микроорганизмов: *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans*, *Desulfonatronum lacustre*, *D. thiodismutans*, *Desulfuribacillus alkaliarsenatis*, *Dethiobacter alkaliphilus*. В этих геномах был проведён поиск детерминант диссимиляционной железоредукции. Из всех рассмотренных микроорганизмов только *Des. alkaliarsenatis* обладал необходимым набором генов, определяющих способность к внеклеточному переносу электронов на минералы Fe(III). В его геноме был обнаружен кластер генов (BNF68_RS13060-13075) ABC-транспортера и двух секретлируемых мультигеновых цитохромов, гомологичных белкам ОмсВ и ОмсС, которые считаются ключевыми железовосстанавливающими компонентами порин-цитохромовых комплексов Pcc-типа у *G. sulfurreducens* PCA (Shi et al. 2012). Помимо этого, в геноме *D. alkaliarsenatis* обнаружены гомолог периплазматического флавоцитохрома FccА модельного железоредуктора *S. oneidensis* MR-1 и два других секретлируемых мультигеновых цитохрома с, которые, вместе с предполагаемым порин-цитохромовым комплексом (BNF68_RS13060-13075), могут составлять цепь внеклеточного переноса электронов на нерастворимый ферригидрит. По несколько мультигеновых цитохромов с, теоретически способных обеспечить восстановление Fe(III), было обнаружено также у *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans*, *Desulfonatronum lacustre* и *D. thiodismutans*, однако отсутствие гомологии

этих цитохромов с ключевыми известными терминальными железоредуктазами не позволило определить их роль в восстановлении ферригидрита, и, с учётом отсутствия стимуляции роста этих организмов ферригидритом, скорее говорит о недиссимиляционном характере железоредукции у них.

Таким образом, к восстановлению синтезированного ферригидрита оказались способны 6 из 7 протестированных видов алкалофильных литотрофных сульфидогенов. Однако только *Desulfuribacillus alkaliarsenatis* обладал полноценным набором генов мультигемовых цитохромов, ответственных за диссимиляционную железоредукцию, что указывает на использование нерастворимых форм Fe(III) в качестве акцепторов электронов этой бактерией. У других протестированных нами сульфидогенов железоредукция, по-видимому, не является энергодающим процессом и обусловлена побочной активностью оксидоредуктазных систем клетки. Физиологическая роль железоредукции у этих микроорганизмов может заключаться в детоксификации сульфида, вырабатываемого в процессе сульфат- или сероредукции, поскольку образование гидротроиллита, связывающее сульфид согласно реакции $Fe^{2+} + S^{2-} + nH_2O = FeS \times nH_2O$, требует предварительного восстановления окисного железа в закисное. В этом случае в насыщенных сульфидом донных отложениях эволюционное преимущество могли получить именно те сульфидогены, которые приобрели способность к железоредукции в ходе эволюции их собственных оксидоредуктаз или в результате горизонтального переноса. Это предположение находит подтверждение данными, полученными при исследовании состава микробных сообществ морских осадков, проведенном *in situ*. Сходство экосистем морских осадков и содовых озёр определяется доминированием цикла серы и ведущей ролью сульфидогенов в анаэробном разложении органического вещества. Для морских осадков Балтийского и Северного морей было показано, что в придонном слое в восстановлении окислов железа активное участие принимают сульфатредуцирующие и сероредуцирующие бактерии (Reyes et al., 2017). Таким образом, тесная связь биогеохимических циклов серы и железа находит свое отражение в экофизиологических возможностях микроорганизмов, условно относящихся к группам сульфидогенов и железоредукторов. Наличие способности к прямому восстановлению нерастворимых соединений железа, обнаруженное нами у шести из семи протестированных таксонов алкалофильных литотрофных сульфидогенов, указывает на широкое распространение этого физиологического свойства у данной группы организмов, а значит, и на существенно более тесную, чем считалось ранее, взаимосвязь биогеохимических циклов серы и железа в анаэробных осадках содовых озёр.

ГЛАВА 4. ОСОБЕННОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ СИНТЕЗИРОВАННОГО ФЕРРИГИДРИТА *GEOALKALIBACTER FERRIHYDRITICUS* В ЧИСТОЙ И БИНАРНЫХ КУЛЬТУРАХ

4.1. Исследование процессов образования минералов железа при восстановлении синтезированного ферригидрита *Geoalkalibacter ferrihydriticus*

Методами Мёссбауэровской спектроскопии в контролируемых лабораторных условиях было проведено исследование влияния AQDS или цитрата Fe(III), внесенных в качестве дополнительных акцепторов электронов, а также исходного количества СФ на процесс восстановления ферригидрита и образование новых железосодержащих минералов *G. ferrihydriticus*.

Влияние дополнительных акцепторов электронов. Были проведены Мёссбауэровские исследования трех серий образцов, представляющих собой минералы железа, образовавшиеся в процессе восстановления СФ штаммом Z-0531^T без дополнительных акцепторов (серия 1), с добавлением 0.5 мМ цитрата Fe(III) (серия 2) и 0.25 мМ AQDS (серия 3). При этом исходное количество Fe(III), добавляемого в среду в виде СФ, варьировалось в диапазоне от 11 до 90 мМ. Кинетика восстановления СФ (45 мМ Fe(III)) *G. ferrihydriticus* была оценена по образованию Fe(II) с феррозином в присутствии цитрата или AQDS и без добавок (Рис.18). Добавление AQDS существенно стимулировало скорость и интенсивность восстановления СФ, в то время как добавление цитрата практически не влияло на этот процесс.

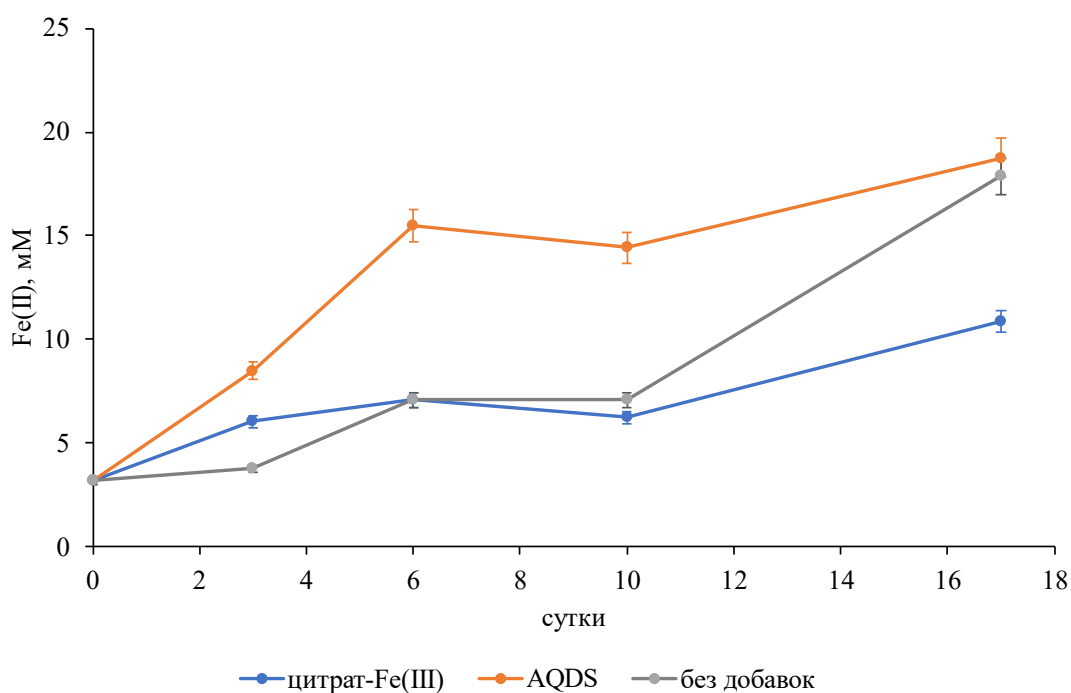


Рисунок 18. Влияние добавления цитрата Fe(III) или AQDS на скорость и интенсивность восстановления СФ *G. ferrihydriticus*.

Спектры образцов, полученных без дополнительных акцепторов (Рис.19 серия 1) при исходном количестве Fe(III) в СФ 11мМ и 45мМ, представляют собой квадрупольные дублеты, которые совпадают со спектром исходного гидроксида железа. Однако проведенные дополнительные исследования при температуре 77 К выявили заметное увеличение относительной интенсивности парциального спектра магнитоупорядоченного типа по сравнению с комнатной температурой, что означало, что в данных условиях восстановление СФ штаммом Z-0531^T приводит к образованию в основном мелких суперпарамагнитных частиц. В Мёссбауэровских спектрах образцов, полученных для тех же количеств СФ в присутствии цитрата (Рис.19 серия 2) и AQDS (Рис.19 серия 3) присутствовал квадрупольный дублет, соответствующий сидериту FeCO₃, в структуре которого степень окисления атомов железа равна +2. Секстет с широкими асимметричными линиями, соответствующий либо нестехиометрическому магнетиту Fe₃O₄, либо смеси магнетита и маггемита γ -Fe₂O₃, наблюдался только при максимальном (90мМ) количестве исходного Fe(III), независимо от присутствия дополнительных акцепторов. Наибольшее относительное содержание сидерита и крупных частиц магнитоупорядоченных фаз наблюдалось в серии 3.

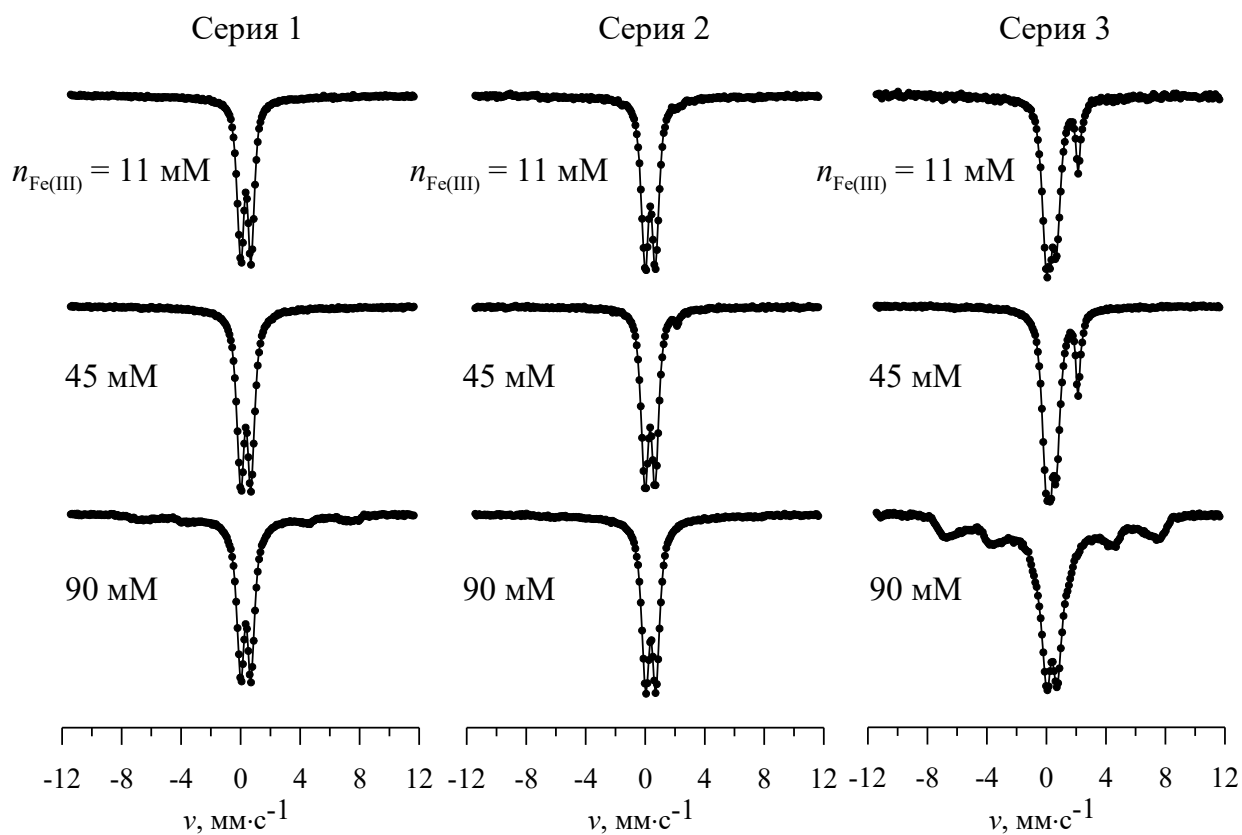


Рисунок 19. Мёссбауэровские спектры образцов, полученные при восстановлении СФ штаммом Z-0531^T различного содержания СФ: серия 1 – без добавления дополнительных акцепторов электронов, серия 2 – с добавлением цитрата Fe(III), серия 3 – с добавлением хинона

Таким образом, было показано, что добавление в среду AQDS, активно использующегося диссимиляционными железоредукторами в качестве переносчика электронов (Bai et al., 2020), приводит к более интенсивному восстановлению СФ и увеличению относительного содержания магнетита и сидерита. Дополнительные эксперименты, проведенные с исходным количеством Fe(III) в СФ, равным 90 мМ, но меняющейся от 0 до 2.5 мМ концентрацией AQDS, показали, что концентрация хинона оказывает существенное влияние на размер образующихся в процессе восстановления СФ частиц магнитоупорядоченных фаз. При концентрации AQDS от 0.1–0.7 мМ происходит увеличение интенсивности парциального спектра магнитоупорядоченного типа, то есть накапливаются магнитоупорядоченные наночастицы магнетита размером 8-16 нм. При концентрации хинона ≥ 1 мМ релаксационный характер Мёссбауэровских спектров становится более выраженным, что обусловлено возрастанием относительного количества мелких суперпарамагнитных частиц размером 4-10 нм. В интервале концентраций AQDS 1.7–2.4 мМ наблюдались скачкообразные изменения относительных интенсивностей парциальных спектров сидерита и магнитоупорядоченных фаз, что указывает на нестабильность условий фазообразования в этой области концентраций.

Влияние исходного количества синтезированного ферригидрита. Для изучения влияния этого параметра на процесс железоредукции были исследованы две серии образцов в присутствии и отсутствии AQDS (0.25 мМ). Для обеих серий содержание Fe(III) в СФ варьировалось в диапазоне от 5 мМ до 150 мМ, а время инкубации составило 1 месяц. Характерные Мёссбауэровские спектры для этих серий представлены на рисунке 20. При малых количествах СФ наблюдалось образование только сидерита, в то время как при больших значениях – образование крупных частиц магнитоупорядоченных фаз. В обеих сериях по мере увеличения содержания Fe(III) в СФ до 30 мМ относительное количество сидерита в образцах оставалось примерно постоянным. В области же содержания Fe(III) от 30 мМ до 70 мМ наблюдались скачкообразные изменения относительного содержания сидерита и магнитоупорядоченных фаз, образованных в результате железоредукции штаммом Z-0531^T. По-видимому, в этой области, которую можно назвать областью нестабильного фазообразования, большое значение имеет соотношение количества клеток железоредуктора к количеству СФ. При содержании Fe(III) в СФ выше 70 мМ наблюдалось образование только магнитоупорядоченных фаз. Таким образом, было показано, что в щелочных условиях при малых исходных количествах СФ ведущим анионом, связывающимся с образующимся в процессе железоредукции закисным железом, является карбонат-ион в то время, как при избытке СФ, ведущую роль начинает играть гидроксид-ион.

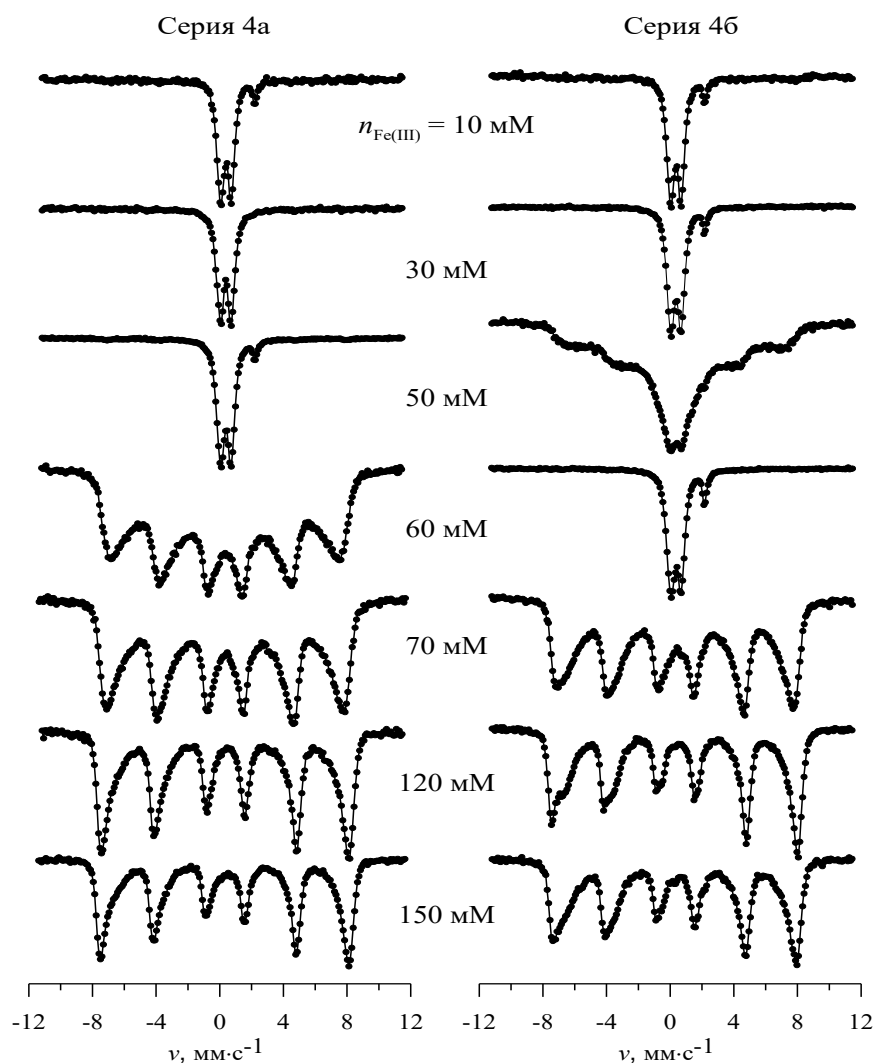


Рисунок 20. Мёссбауэровские спектры образцов, полученные при восстановлении СФ штаммом Z-0531^T различного содержания СФ: серия 4а – без добавления дополнительных акцепторов электронов, серия 4б – с добавлением 0.1 г/л хинона.

4.2. Восстановление синтезированного ферригидрита бинарной анаэробной культурой *Anaerobacillus alkalilacustris* и *Geoalkalibacter ferrihydriticus* при pH 9.5

Картина функционирования микробного сообщества, реконструированная на основе изучения чистых культур, может не соответствовать объективным взаимодействиям, слагающимся в природе, где действует множество дополнительных факторов, которые могут существенно изменять отношения, выявленные в лабораторных экспериментах. В этом смысле работа с комбинированием чистых культур дает возможность приблизиться к пониманию трофических взаимодействий, существующих в природе. При изучении алкалофильной железоредукции нами было проведено исследование метабиотического взаимодействия бинарной культуры, предполагающее, что пищевая цепь складывается из звеньев использования последующим компонентом продуктов обмена предыдущего,

восстанавливающего синтезированный ферригидрит. Культура состояла из двух анаэробных бактерий, выделенных из осадков содового озера Хадын (Тыва) - алкалофильной органотрофной анаэробной бациллы *Anaerobacillus alkalilacustris* (Заварзина и др., 2009), сбраживающей маннит с образованием формиата, ацетата, лактата, сукцината и этанола и не способной к железоредукции, и диссимиляционной железоредуцирующей бактерии *G. ferrihydriticus*, развивающейся за счет анаэробного дыхания с органическими кислотами в качестве донора электронов. В ходе экспериментов предполагалось продемонстрировать окисление ацетата *G. ferrihydriticus*, образующегося в процессе сбраживания маннита *A. alkalilacustris* в условиях недостатка и избытка СФ. Важность подобного эксперимента заключалась в том, что ацетат является ключевым соединением, накапливающимся в процессе анаэробного разложения органического вещества, и его дегградация требует либо привлечения в качестве внешних акцепторов электронов соединений переменновалентных элементов, либо осуществляется синтрофно.

Опыты с бинарной культурой проводили при двух соотношениях «донор : акцептор» - 1 : 2 (O1) и 1 : 20 (O2). Варианты экспериментов и контролей представлены в таблице 5. Также был проведен дополнительный эксперимент с чистой культурой *G. ferrihydriticus*, в котором в качестве доноров электронов в среду совместно были добавлены формиат (2 мМ), ацетат (2 мМ), лактат (2 мМ), этанол (1 мМ) и сукцинат (2 мМ). Кроме того, были поставлены эксперименты с каждым из вышеперечисленных доноров по отдельности. Во всех опытах в качестве акцептора электронов использовали СФ с конечным содержанием Fe(III) 10 (O1) или 100 (O2) мМ. Каждый опыт проводили в трех повторностях.

Таблица 5. Варианты опытов и контролей

Параметры эксперимента	Опыты		Контроли				
	O1	O2	K1	K2	K3	K4	K5
<i>A. alkalilacustris</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>G. ferrihydriticus</i>	+	+	-	-	+	-	-
маннит, 1 г/л	+	+	+	+	-	+	-
ацетат, 1 г/л	-	-	-	-	+	-	+
СФ, Fe(III) 10 мМ	+	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-
СФ, Fe(III) 100 мМ	-	+	-	-/+	-/+	-/+	-/+

Обозначения. (+) – присутствие; (-) – отсутствие; (+/-) – варианты в содержании СФ.

4.2.1. Восстановление синтезированного ферригидрита бинарной культурой *A. alkalilacustris* и *G. ferrihydriticus* использующей маннит

Визуально, восстановление железа в опытах серий О1 и О2 на среде с маннитом началось на третьи сутки после засева культур. В первые двое суток после начала эксперимента в супернатанте наблюдались клетки только *A. alkalilacustris*, численность которых не зависела от исходного количества СФ и достигала 10^7 кл/мл в первые сутки после начала эксперимента, а затем снижалась вследствие лизиса, который шел быстрее при избытке СФ. Уже на третьи сутки после начала эксперимента клеток *A. alkalilacustris* в среде не обнаруживалось. Единичные клетки *G. ferrihydriticus* появлялись на вторые сутки после начала эксперимента, но экспоненциальный рост наблюдался в обеих сериях опытов на 2–4 сутки, после чего наступала стационарная фаза, в ходе которой численность клеток железоредуктора существенно не менялась (Рис.21а).

Изменение концентрации маннита и продуктов брожения согласовывались с данными по изменению численности бактерий. В первые сутки после начала эксперимента наблюдалось быстрое снижение концентрации маннита с одновременным накоплением продуктов его брожения за счет роста *A. alkalilacustris*: формиата, этанола, ацетата и, в небольших количествах, лактата и сукцината. Далее, начиная с третьих суток после начала эксперимента, наблюдалось постепенное снижение концентрации формиата вплоть до полного его исчерпания в опыте с избытком СФ, а также снижение концентрации этанола, на фоне постепенного увеличения концентрации ацетата. В случае избытка СФ окисление формиата и этанола, сопровождающееся накоплением ацетата и образованием двухвалентного железа, шло интенсивнее, чем при недостатке СФ (Рис.21б).

Проведенные Мёссбауэровские исследования показали, что при недостатке СФ основным восстановленным продуктом являлся сидерит, представленный исключительно однородными по размеру сферолитами (Рис.22а), размер которых колебался в пределах 3-5 мкм сидерит, в то время как при избытке СФ формировалась магнитоупорядоченная фаза, представляющая собой суперпарамагнитные частицы нестехиометрического магнетита (Fe_3O_4) или смеси магнетита и маггемита ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (Табл.6), неоднородных по размеру и образующих агрегаты, в которых сложно было выделить отдельные кристаллы. Мёссбауэровские исследования осадков в контролях показали, что рост *A. alkalilacustris* на манните ни при избытке, ни при недостатке СФ не приводит к его восстановлению, хотя часть СФ перекристаллизовывалась в лепидокрокит ($\gamma\text{-FeOOH}$). В контроле с *G. ferrihydriticus* и ацетатом в качестве донора электронов при недостатке СФ происходило образование

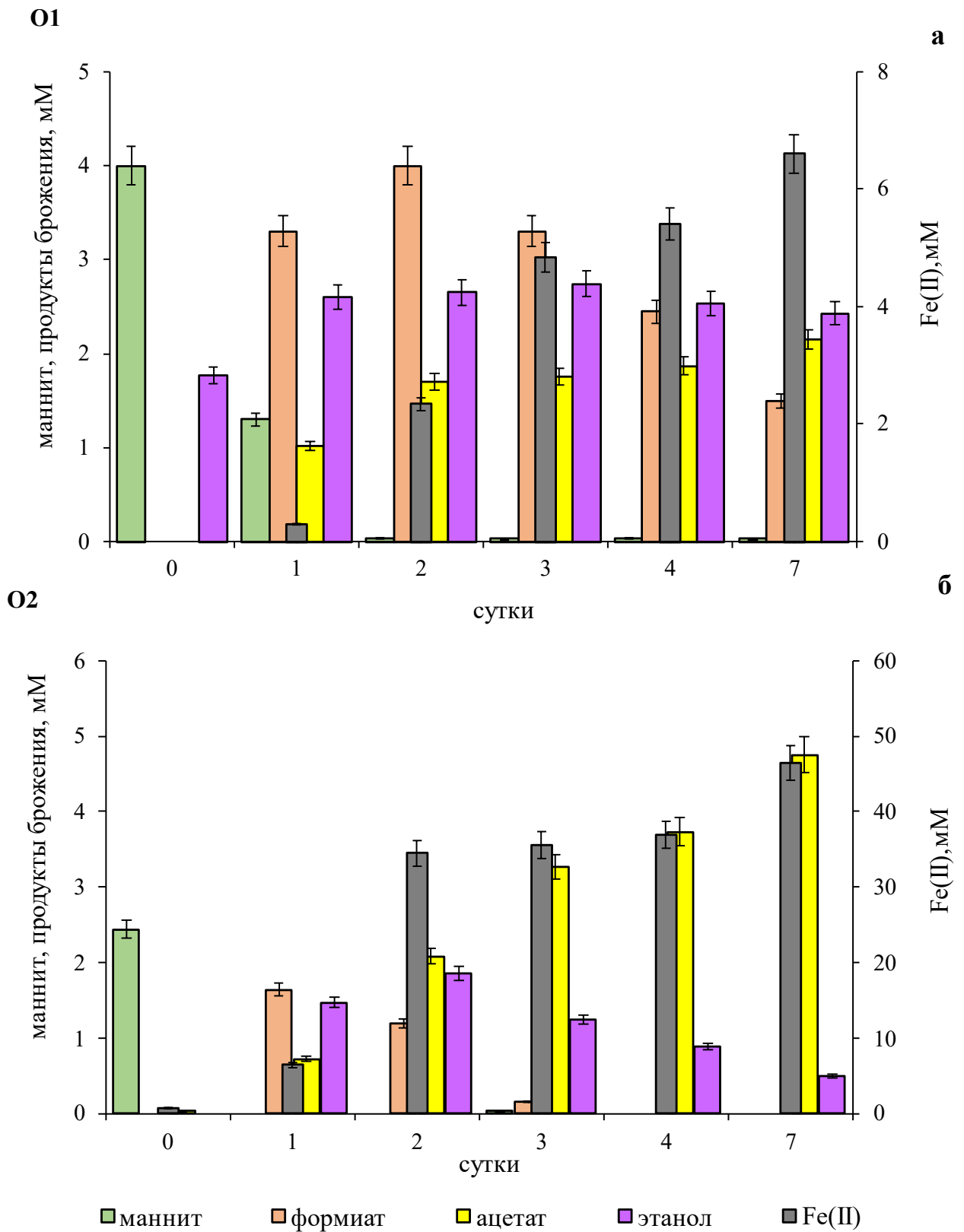


Рисунок 21. Восстановление ферригидрита бинарной культурой *A. alkalilacustris* и *G. ferrihydriticus*: (а) при недостатке СФ, (б) при избытке СФ. Данные по лактату и сукцинату не приведены.

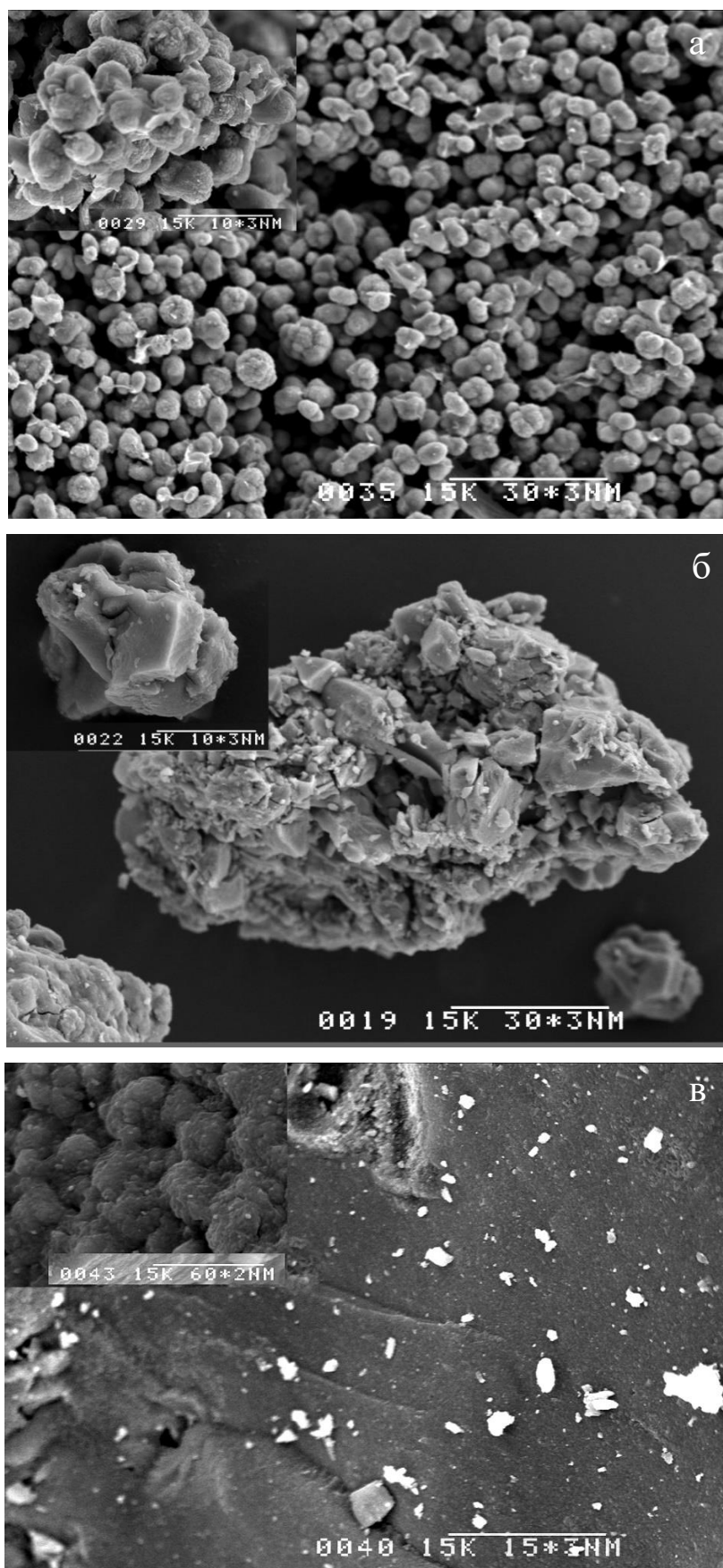


Рисунок 22. Морфология осадков полученных (а) – при недостатке СФ (О1), (б) при избытке СФ О2, (в) в контроле (К5).

сидерита, а при избытке СФ, наоборот, относительное содержание сидерита падало и основной образующейся фазой был нестехиометрический магнетит, что полностью подтверждало проведенные ранее эксперименты (раздел 4.1.). В абиогенных контролях с маннитом или ацетатом при недостатке СФ наблюдался переход части СФ в лепидокрокит, в то время как при избытке СФ параметры спектра не отличались от параметров спектра исходного СФ. Относительное содержание железа в исходной и новообразованных фазах опытных и контрольных серий суммированы в таблице 6.

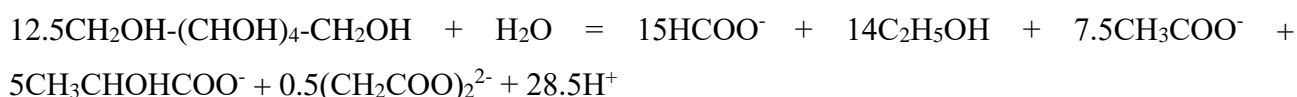
Таблица 6. Относительное содержание атомов железа (%) в минеральных фазах образцов твердых фаз опытных и контрольных серий* (усредненные данные).

Минеральные фазы, %	10 мМ Fe(III)					100 мМ Fe(III)				
	O1	K2	K3	K4	K5	O2	K2	K3	K4	K5
Синтезированный ферригидрит	35	65	74	78	33	0	70	0	71	87
Лепидокрокит	0	35	0	22	67	0	30	0	29	13
Сидерит	41	0	26	0	0	12	0	10	0	0
Магнитоупорядоченная фаза	0	0	0	0	0	88	0	90	0	0
Неидентифицированная фаза (Fe ²⁺)	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Расшифровку обозначений контрольных серий см. Табл. 5.

Таким образом, окисление маннита в бинарной культуре приводило к восстановлению СФ, при этом мы доказали метабиотический характер взаимодействия пары *A. alkalilacustris* и *G. ferrihydriticus*. Оба организма были индифферентны друг к другу, за исключением использования одним из них продуктов обмена другого, которое, однако, не влияло на обмен первого.

Динамика развития бинарной культуры на манните и СФ обнаруживала две четкие стадии по времени. Во время первой стадии, продолжающейся первые трое суток, происходило сбраживание маннита *A. alkalilacustris* без существенного влияния на процесс второго партнера железоредуктора и СФ по реакции:



Несмотря на то, что *A. alkalilacustris* не нуждается в акцепторах для сбраживания маннита, добавление избытка СФ в чистую культуру *A. alkalilacustris* приводило к сдвигу продуктов брожения в сторону образования большего количества формиата, ацетата и сукцината. Вторая стадия, соответствующая окончанию брожения и накоплению его продуктов, характеризовалась восстановлением СФ, связанным с началом роста *G. ferrihydriticus* и последовательным использованием им в качестве доноров электронов сначала формиата, а потом этанола, что не соответствовало энергетической эффективности этих реакций, рассчитанных для двух вариантов опытов: с 10 мМ внесенного ферригидрита (O1) и 100 мМ (O2), при pH 9.5: Если рассмотреть эти реакции с точки зрения энергетической эффективности, то они располагаются в противоположном порядке: сукцинат – лактат – этанол – формиат:

	O1, ΔG_f	O2, ΔG_f
$\text{HCOO}^- + 2\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O} = \text{HCO}_3^- + 2\text{Fe}^{2+} + 2\text{H}^+$	-207.61	-106.89
$\text{CH}_3\text{COO}^- + 8\text{Fe}^{3+} + 4\text{H}_2\text{O} = 2\text{HCO}_3^- + 8\text{Fe}^{2+} + 9\text{H}^+$	-745.61	-342.74
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 4\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O} = \text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{Fe}^{2+} + 5\text{H}^+$	-422.563	-625.81
$\text{CH}_3\text{CHONCOO}^- + 4\text{Fe}^{3+} + 2\text{H}_2\text{O} = \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^-$ $+ 4\text{Fe}^{2+} + 5\text{H}^+$	-881.923	-234.74
$(\text{CH}_2\text{COO})_2^{2-} + 14\text{Fe}^{3+} + 8\text{H}_2\text{O} = 4\text{HCO}_3^- + 14\text{Fe}^{2+}$ $+ 16\text{H}^+$	-1330.83	-625.81

Проведенные эксперименты наглядно продемонстрировали, что энергетическая эффективность реакции не всегда является для бактерии определяющей, если существует возможность выбора субстрата из множества, и предпочтение здесь может определяться не термодинамическими, а биохимическими факторами клеточной машинерии.

4.2.2. Восстановление синтезированного ферригидрита *G. ferrihydriticus* с комбинацией доноров

Для подтверждения полученных результатов были проведены эксперименты, в которых в качестве доноров электронов для *G. ferrihydriticus* в среду были одновременно добавлены все продукты, образующиеся при сбраживании маннита *A. alkalilacustris* в равных концентрациях (по 2 мМ), как при избытке, так и недостатке СФ (Рис.23). В результате роста *G. ferrihydriticus* на этой среде наблюдалось восстановление СФ, обусловленное последовательным использованием микроорганизмом имеющихся доноров в следующем

порядке: формиат – этанол – лактат. При этом в случае недостатка СФ лактат окислялся лишь наполовину (Рис.23а). Концентрация сукцината оставалась неизменной, а концентрация ацетата возрастала, как в опытах серий О1 и О2, но, в отличие от них, более интенсивно при недостатке СФ, а не при его избытке.

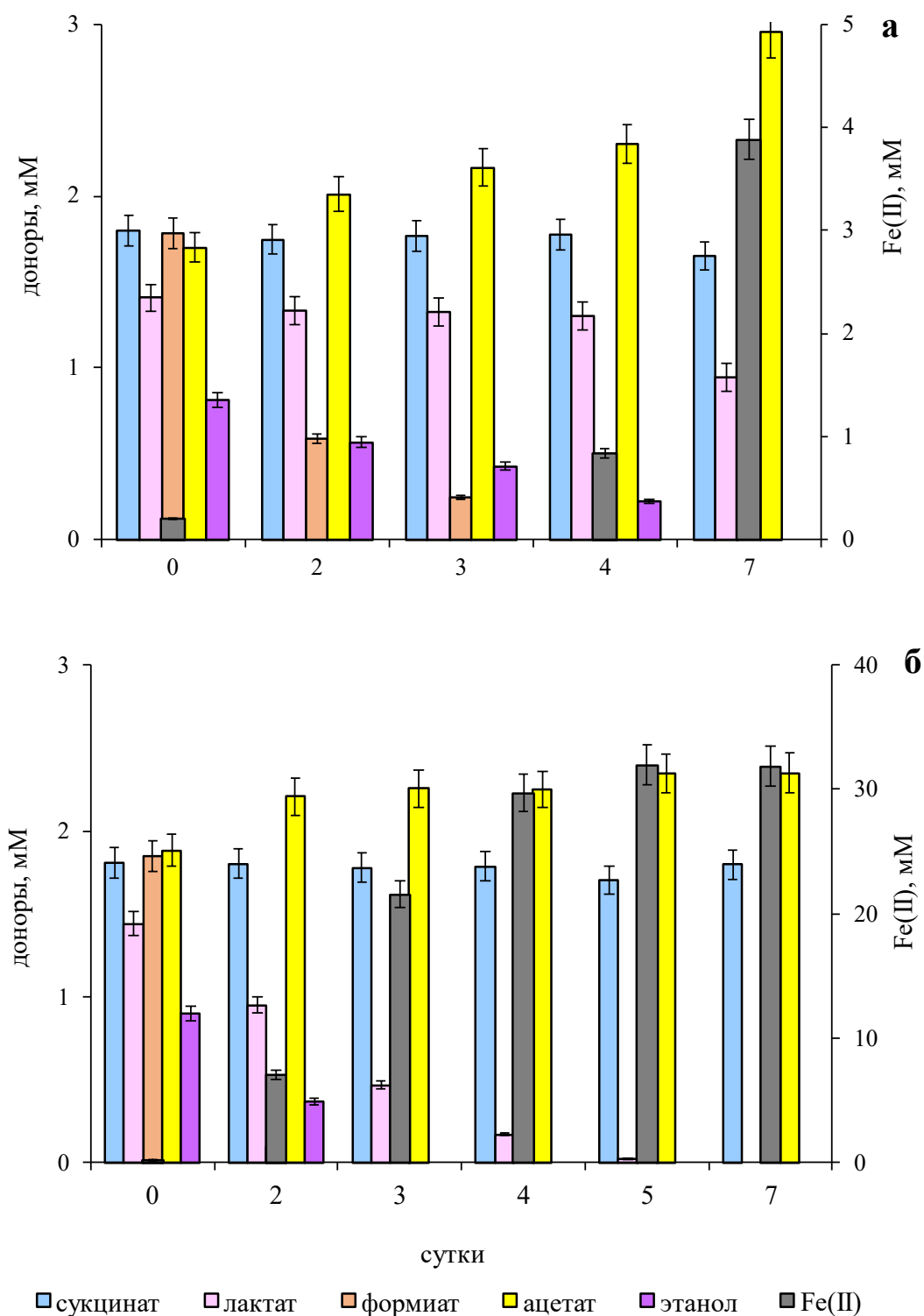


Рисунок 23. Восстановление ферригидрита *G. ferrihydriticus* с комбинацией доноров: (а) при недостатке СФ, (б) при избытке СФ.

Полученные результаты, во-первых, выявили способность *G. ferrihydriticus* последовательно использовать разные доноры электронов при восстановлении железа, и, во-вторых, подтвердили закономерность последовательности потребления доноров в порядке: формиат – этанол – лактат, что противоречило энергетической эффективности реакций.

4.2.3. Восстановление синтезированного ферригидрита *G. ferrihydriticus* с отдельными донорами

Поскольку во всех вышеперечисленных опытах не использовался сукцинат, необходимо было выяснить принципиальную возможность его окисления *G. ferrihydriticus*. С этой целью был поставлен еще один эксперимент, в котором все продукты брожения, образующиеся при разложении маннита, были добавлены в среду в качестве доноров электронов по отдельности, при избытке или недостатке СФ, и было доказано, что все соединения, не исключая сукцинат, использовались *G. ferrihydriticus* в качестве доноров электронов. При недостатке СФ с этанолом или лактатом, добавленными в качестве доноров электронов, наблюдалось накопление ацетата, связанное с их неполным окислением, в то время как при избытке СФ образующийся ацетат *G. ferrihydriticus* окислялся по исчерпанию этанола или лактата. Было обнаружено, что при недостатке СФ в первые трое суток эксперимента окисление лактата и этанола не сопровождалось восстановлением железа. Недоиспользование железа при сведении стехиометрии реакций окисления лактата и этанола указывает на то, что реакция восстановления железа, по-видимому, была не единственной энергодающей, что заставляло искать дополнительные возможности образования ацетата *G. ferrihydriticus*.

4.3. Восстановление синтезированного ферригидрита бинарной анаэробной культурой *Clostridium alkalicellulosi* и *Geoalkalibacter ferrihydriticus* при разложении микрокристаллической целлюлозы

Разложение полисахаридов представляет собой первый этап процесса биodeградации органического вещества, в анаэробных микробных сообществах осуществляемый микроорганизмами-целлюлозолитиками. Продукты разложения полисахаридов – сахара, спирты, органические кислоты и водород в дальнейшем используются разнообразными физиологическими группами анаэробных прокариот, составляющими трофическую цепочку, в результате чего происходит полная минерализация органического вещества и возвращение углекислоты в глобальный биогеохимический цикл углерода. В простейшем случае трофическая цепочка может быть представлена двумя физиологическими группами – первичным анаэробом-целлюлозолитиком и вторичным анаэробом, использующим образовавшиеся продукты метаболизма в реакциях анаэробного дыхания с привлечением

внешнего акцептора электронов. Благодаря имеющейся в коллекции Т.Н. Жилиной выделенной ею первой алкалофильной целлюлозолитической бактерии *Clostridium alkalicellulosi*, разлагающей целлюлозу с образованием этанола, лактата, формиата, ацетата и молекулярного водорода в качестве конечных продуктов (Жилина и др., 2005) мы смогли проверить возможность восстановления ферригидрита *G. ferrihydriticus* на среде с микрокристаллической целлюлозой (МКЦ) в короткой трофической цепочке «целлюлозолитик – вторичный анаэроб».

Эксперименты проводили в 120 мл флаконах с 70 мл среды X (раздел 2.2.) и 50 мл газовой фазы, заполненной 100% N₂, в присутствии СФ (количество Fe(III) 100 мМ) и 1 г/л МКЦ (Sigmacell 101 (Sigma, США)). В процессе роста измеряли изменение концентрации продуктов метаболизма и образование Fe(II). Определение образовавшихся минеральных фаз проводили методом Мёссбауэровской спектроскопии. Инкубацию проводили в течении 200 суток.

Через 14 дней инкубации цвет СФ изменился и стал черным, за счет образования восстановленной магнитной минеральной фазы. К этому моменту количество клеток *C. alkalicellulosi* и *G. ferrihydriticus* в супернатанте достигло 7×10^7 и 5×10^6 клеток/мл, соответственно, и уже не изменялось до конца эксперимента, что свидетельствовало о достижении стационарной фазы роста. Одновременно концентрация формиата, продуцируемого *C. alkalicellulosi* из МКЦ, начала снижаться (Табл.7), и к 50-му дню инкубации формиат был полностью окислен. После этого наблюдалось снижение концентрации этанола с ≈ 1 мМ на 50-й день до ≈ 0.1 мМ к концу эксперимента. Содержание ацетата увеличивалось в течение всего времени инкубации до 4.5 мМ к концу эксперимента. Конечная концентрация Fe(II), экстрагируемого из твердой фазы с помощью 6Н HCl, составляла 22 мМ (Табл.7). Мёссбауэровский анализ, проведенный после окончания эксперимента, показал, что новообразованные минеральные фазы представляют собой смесь нестехиометрического магнетита и сидерита.

В целом характер взаимодействия *C. alkalicellulosi* и *G. ferrihydriticus* оказалась сходным с таковым в бинарной культуре с *A. alkalilacustris* – железоредуктор использовал продукты, образованные *C. alkalicellulosi* при разложении МКЦ, не влияя на рост целлюлозолитика. Разница была видна только в изменении концентрации продуктов: из-за того, что МКЦ является нерастворимым субстратом, ее разложение происходило медленнее, чем сбраживание маннита, поэтому в первые 14 дней, несмотря на видимое восстановление ферригидрита, не наблюдалось заметного уменьшения в концентрации продуктов метаболизма, которое началось только после перехода *C. alkalicellulosi* в стационарную фазу роста. При этом, как и в случае с *A. alkalilacustris*, *G. ferrihydriticus* сначала полностью окислил

формиат, затем этанол и, очевидно, использовал молекулярный водород, концентрация которого в контрольном эксперименте с чистой культурой целлюлозолитика была существенно выше, чем в бинарной культуре (Рис.24). При этом концентрация ацетата постоянно увеличивалась, и к концу эксперимента более чем в 3.5 раза превышала такую в контрольном эксперименте с чистой культурой *C. alkalicellulosi* (Рис.24).

Таблица 7. Продукты метаболизма, образующиеся в процессе совместного роста *C. alkalicellulosi* и *G. ferrihydriticus* на микрокристаллической целлюлозе и синтезированном ферригидрите (средние значения по двум повторностям).

сутки	Fe(II) и продукты метаболизма, мМ					
	Fe(II)	формиат	ацетат	лактат	этанол	водород
2	3.05	0	0.5	0.0	0.0	0.03
8	8.95	0.35	1.95	0.2	0.45	0.39
14	13.1	0.2	2.35	0.1	0.65	0.39
22	10.95	0.25	3.0	0.2	0.8	0.85
50	13.7	0.05	3.75	0.1	1.0	0.79
165	15.65	0.0	4.55	0.2	0.2	0.40
200	14.55	0.0	4.5	0.15	0.1	0.39

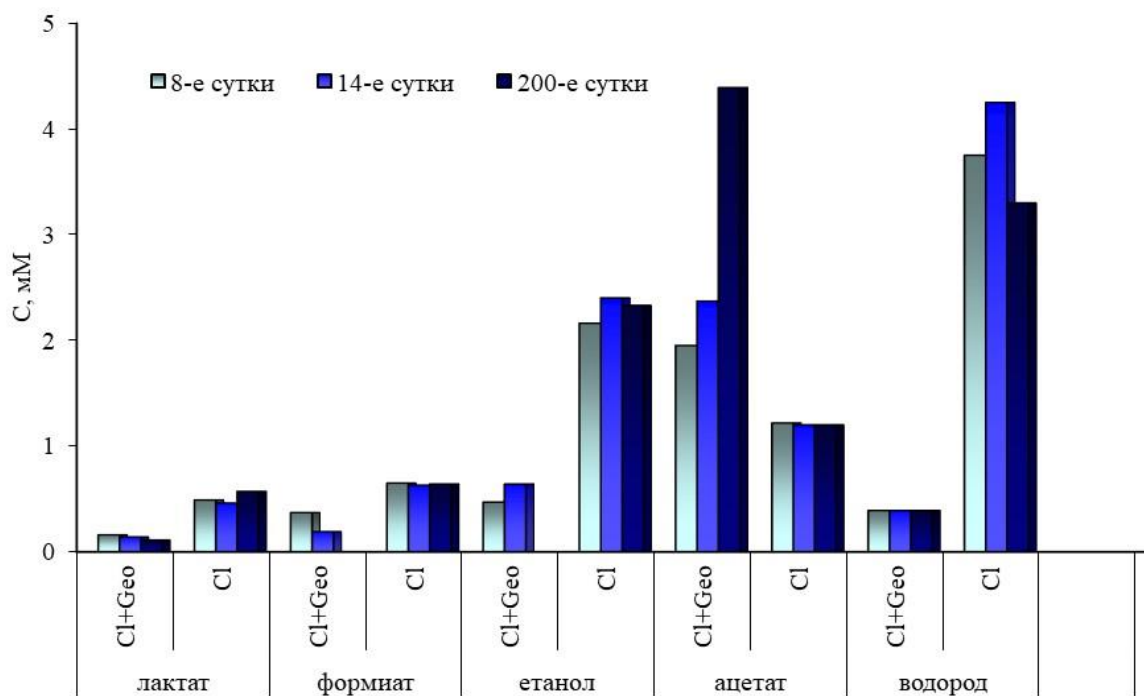


Рисунок 24. Сравнение продуктов метаболизма, образуемых *C. alkalicellulosi* при росте на МКЦ и СФ в чистой культуре (CI) и бинарной культуре с *G. ferrihydriticus* (CI+Geo).

Полученные результаты позволили по-иному взглянуть на процессы окисления ацетата вторичными анаэробами, происходящие в анаэробном микробном сообществе. Оказалось, что способность окислять ацетат в чистой культуре может быть не реализована в сообществе, где всегда существует возможность выбора донора. В проведенных экспериментах жизнедеятельность *G. ferrihydriticus* приводила к образованию, а не потреблению ацетата, то есть он выступал в качестве ацетогена, а не ацетотрофа. Большую роль в окислении ацетата в сообществе, по-видимому, играют узкоспециализированные микроорганизмы, к которым, в первую очередь, следует отнести облигатных синтрофов.

4.4. Восстановление синтезированного ферригидрита синтрофной культурой *Candidatus "Contubernalis alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* на этаноле

Межвидовые окислительно-восстановительные взаимодействия играют фундаментальную роль в процессе деструкции органических веществ и их полного преобразования до CO₂ и CH₄ через серию метаболических взаимодействий. Более 50 лет назад был открыт механизм непрямого межвидового переноса электронов в синтрофных ассоциациях через водород, хотя позднее было показано, что переносчиками электронов между синтрофными партнерами в этом процессе могут выступать формиат, антрахинон-2,6-дисульфат, цистеин или неорганические соединения серы (Stams et al., 2006; Morris et al., 2013). Помимо метаногенов, являющихся наиболее изученной группой водородоиспользующих членов синтрофных ассоциаций, были продемонстрированы межвидовые взаимодействия органотрофов с гидрогенотрофными сульфат- или железовосстанавливающими бактериями (Stams et al., 2005; Lovley, 2017). Прямой межвидовой перенос электронов, как альтернатива непрямому механизму, был впервые описан для бинарной культуры железовосстанавливающих бактерий *Geobacter metallireducens* и *Geobacter sulfurreducens*; он осуществляется либо непосредственно через мультигемовые цитохромы с-типа и электропроводящие пили, либо при посредничестве электрон-проводящих минералов, таких как магнетит (Summers et al., 2010; Rotaru et al., 2014; Kato et al., 2012a).

Известно, что pH влияет на термодинамику и кинетику окислительно-восстановительных реакций; в частности, было показано, что доступная энергия реакций синтрофного окисления увеличивается с ростом pH (Jin and Kirk, 2018a, b). Однако, несмотря на интенсивные исследования межвидового переноса электронов в нейтральных условиях, информация об этом типе микробной кооперации в щелочных средах (таких как содовые озера) очень ограничена. В 2005 году нами была описана первая синтрофная облигатно алкалофильная бактерия *Candidatus "Contubernalis alkalaceticum"*, окисляющая ацетат, этанол

и некоторые другие органические соединения совместно с галоалкалифильными гидрогенотрофными сульфатредуцирующими бактериями рода *Desulfonatronum* (Жилина и др., 2005). Позднее была исследована метаногенная ассоциация, содержащая облигатные синтрофные бактерии, близкородственные *Ca. "C. alkalaceticum"* (99% сходства последовательности гена 16S рНК), что доказывало его способность взаимодействовать с различными физиологическими группами гидрогенотрофных бактерий (Sorokin et al., 2016). Кроме того, Д.Ю. Сорокиным была описана синтрофная бактерия *Candidatus "Syntrophonatronum acetioxidans"*, использующая только ацетат в ассоциации с гидрогенотрофным партнером из рода *Desulfonatronospira* (Sorokin et al., 2014b), а также три новых рода синтрофов, способных окислять прямоцепочечные жирные кислоты в ассоциации с алкалофильными метаногенами рода *Methanocalculus* или сульфатредуцирующими бактериями (Sorokin et al., 2016). Все эти бактерии принадлежат к порядку *Syntrophomonadales*, являются облигатными синтрофами, и попытки выделить их в чистые культуры оказались безуспешными. Каких-либо сведений о возможности синтрофного окисления органических веществ алкалофильными бактериями в ассоциации с гидрогенотрофными железоредукторами на момент начала наших исследований не было.

4.4.1. Получение устойчивой синтрофной ассоциации *Ca. "Contubernalis alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus*

Синтрофная ассоциация, состоящая из облигатно анаэробной споровой органотрофной бактерии *Ca. "Contubernalis alkalaceticum"* штамм Z-7904^T (=VKM B-2362^T) и гидрогенотрофной сульфатредуцирующей бактерии *Desulfonatronum cooperativum*, штамм Z-7999^T (DSMZ=16749^T=VKM B-2329^T) (Zhilina et al., 2005) была выделена путем многократных пересевов накопительной культуры, полученной из донных осадков озера Хадын (республика Тыва, Россия), на среде, содержащей ацетат натрия (3 г/л) и сульфат натрия (3 г/л). Нами было доказано, что споры *Ca. "C. alkalaceticum"* термостабильны и выдерживают нагревание до 100 °С в течении 10 мин, сохраняя жизнеспособность. Все попытки вырастить *Ca. "C. alkalaceticum"* в отсутствие гидрогенотрофных СРБ оказались безуспешны. Было показано, что второй член ассоциации может быть заменен любым видом водород-окисляющих СРБ, способным расти в заданных физико-химических условиях. В синтрофной ассоциации *Ca. "C. alkalaceticum"* рос за счет окисления ацетата, этанола, пропанола, изопропанола, серина, фруктозы и изомалянной кислоты. В ассоциации соотношение клеток культуры *Ca. "C. alkalaceticum"* и *D. cooperativum* никогда не превышало 1:10. Характерной особенностью, подтверждающей синтрофные отношения двух микроорганизмов, являлось то, что единичные клетки культуры облигатного синтрофа

встречались крайне редко, причем в большинстве случаев они были плотно окружены клетками сульфидогена (Рис.25).

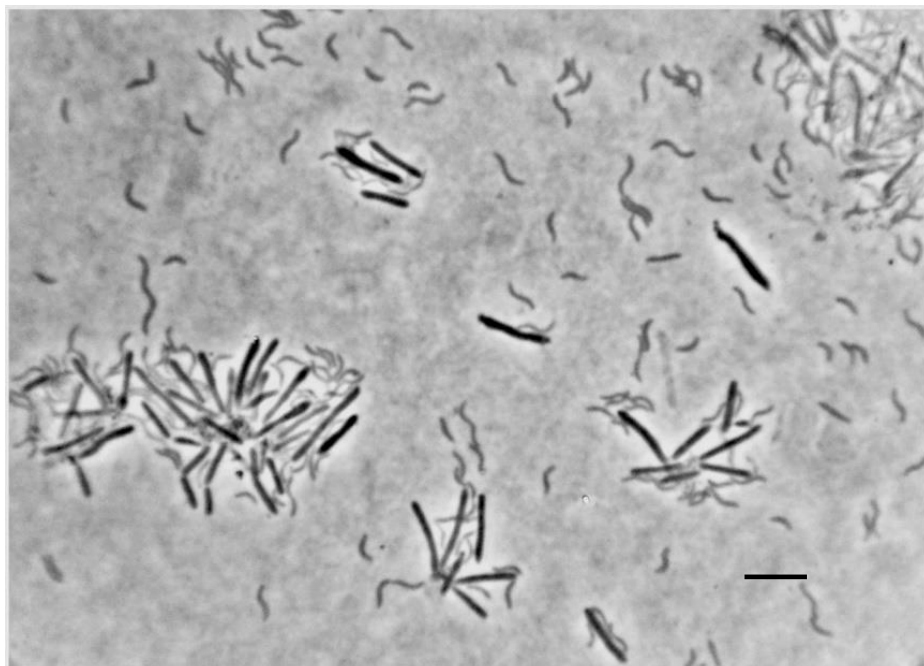


Рисунок 25. Морфология клеток культуры *Ca.* “*C. alkalaceticum*” в синтрофной ассоциации с *D. cooperativum*, растущей на ацетате. Масштаб 5 мкм.

Для проверки возможности синтрофного взаимодействия *Ca.* “*C. alkalaceticum*” с *G. ferrihydriticus* мы подвергли культуру *Ca.* “*C. alkalaceticum*” и *D. cooperativum* нагреванию при 80 °С в течение 10 мин, в результате чего в культуре оставались только споры *Ca.* “*C. alkalaceticum*”. Полученную пастеризованную культуру использовали для 5% засева сред, где сульфат был заменен синтезированным ферригидритом (концентрация Fe(III) 75 мМ), а в качестве субстратов были добавлены ацетат, этанол, пропанол, изопропанол, серин, фруктоза или изомасляная кислота в количестве 25 мМ. Эти же среды засевали культурой *G. ferrihydriticus* (5% об), выращенной на СФ и ацетате. После инкубации в течение 30 дней при 35 °С и трех последовательных пересевов, выяснилось, что устойчивое восстановление ферригидрита, сопровождающееся ростом обоих микроорганизмов, наблюдалось только в варианте с этанолом. В случае остальных субстратов либо отсутствовали клетки *G. ferrihydriticus* и *Ca.* “*C. alkalaceticum*” и не происходило восстановления СФ (пропанол, изопропанол, серин, фруктоза, изомасляная кислота), либо отсутствовали клетки *Ca.* “*C. alkalaceticum*” (ацетат). Таким образом, для исследования межвидовых взаимоотношений *Ca.* “*C. alkalaceticum*” с *G. ferrihydriticus* был выбран этанол.

4.4.2. Кинетика роста синтрофной ассоциации *Ca. "Contubernalis alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* на синтезированном ферригидрите и этаноле

Нетипичным для синтрофных ассоциаций в нашем эксперименте являлось то, что этанол мог служить субстратом для обоих членов бинарной ко-культуры, однако для его использования *G. ferrihydriticus* был необходим ферригидрит, а *Ca. "C. alkalaceticum"* нуждался в присутствии партнера, использующего водород. Таким образом, в этих условиях можно было ожидать конкуренции двух процессов - органотрофного или/и гидрогенотрофного восстановления железа, оба с участием *G. ferrihydriticus*.

Активный рост *G. ferrihydriticus* на среде с ферригидритом начинался через 3 дня инкубации и сопровождался восстановлением СФ. В течение первых 13 дней инкубации было зарегистрировано активное восстановление ферригидрита, сопровождающееся окислением этанола и образованием эквивалентного количества ацетата (Табл. 8). Рост *Ca. "C. alkalaceticum"* начался после 10-го дня инкубации, когда основная часть ферригидрита была восстановлена *G. ferrihydriticus*. За последние 11 дней в среднем было использовано 3.5 мМ этанола и произведено 4.5 мМ ацетата, при практически неизменной концентрации Fe(II). Проведенная к концу эксперимента оценка численности обоих микроорганизмов методом высокопроизводительного секвенирования участков гена 16S рРНК показало, что соотношение клеток *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* составляет 1:11 (Рис.26 (последняя колонка)), что соответствует ранее установленному соотношению клеток в синтрофной ассоциации с сульфидогеном. При этом, в отличие от сульфидогенной ассоциации, клетки бактерий колонизировали минеральные частицы, но тесного контакта между двумя видами зафиксировано не было. Таким образом, в присутствии ферригидрита, *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* конкурировали друг с другом за этанол. При этом рост синтрофа начинался только тогда, когда дальнейшее восстановление ферригидрита затруднялось образовавшимися восстановленными продуктами, что заставляло *G. ferrihydriticus* переключаться на гидрогенотрофный метаболизм в качестве партнера *Ca. "C. alkalaceticum"*, производя дополнительное количество ацетата, так же как и при росте в бинарной культуре с *A. alkalilacustris* (см. раздел 4.2).

Проведенный Мёссбауэровский анализ образцов, отобранных после 5 дней инкубации в условиях преобладания *G. ferrihydriticus*, показал, что восстановление ферригидрита привело к образованию мелких частиц магнетит-магемитовой смеси (30%) и сидерита (3%). После окончания эксперимента выяснилось, что 16% магнетита, образовавшегося ранее, претерпели значительные трансформации в процессе роста культуры, а именно произошло образование гидратированных гидратированных карбонатов железа, содержащих атомы закисного и

окисного железа и известных в англоязычной литературе как green rust. Кроме того, возросло общее содержание сидерита (Табл.9). В стерильном контроле структурных изменений ферригидрита не наблюдалось.

Таблица 8. Рост *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* на среде с синтезированным ферригидритом (средние значения со стандартными отклонениями).

сутки	этанол, мМ	ацетат, мМ	H ₂ , мМ	Fe(II), мМ	<i>Ca. "C. alkalaceticum"</i> , клетки/мл	<i>G. ferrihydriticus</i> , клетки/мл
0	27.9±3.0	0	ПО	1.8±0.9	3.5±1.9×10 ⁵	1.0±0.3×10 ⁵
5	23.0±1.5	4.6±0.2	ПО	12.4±0.9	8.5±2.7×10 ⁵	7.0±1.9×10 ⁷
7	20.9±2.6	6.3±0.6	ПО	17.1±0.3	1.0±0.9×10 ⁶	5.6±2.2×10 ⁷
13	20.8±3.2	7.0±0.3	0.1±0.02	24.8±0.9	1.5±1.0×10 ⁶	4.8±2.1×10 ⁷
19	19.5±3.3	7.3±0.6	0.2±0.02	26.0±0.3	6.5±2.3×10 ⁶	7.5±3.5×10 ⁶
26	18.6±3.4	8.7±0.8	ПО	27.3±0.8	1.3±0.7×10 ⁶	6.0±0.9×10 ⁶
34	17.3±1.8	11.5±1.6	ПО	25.2±1.1	3.0±1.2×10 ⁶	6.3±1.1×10 ⁶

ПО – ниже предела обнаружения.

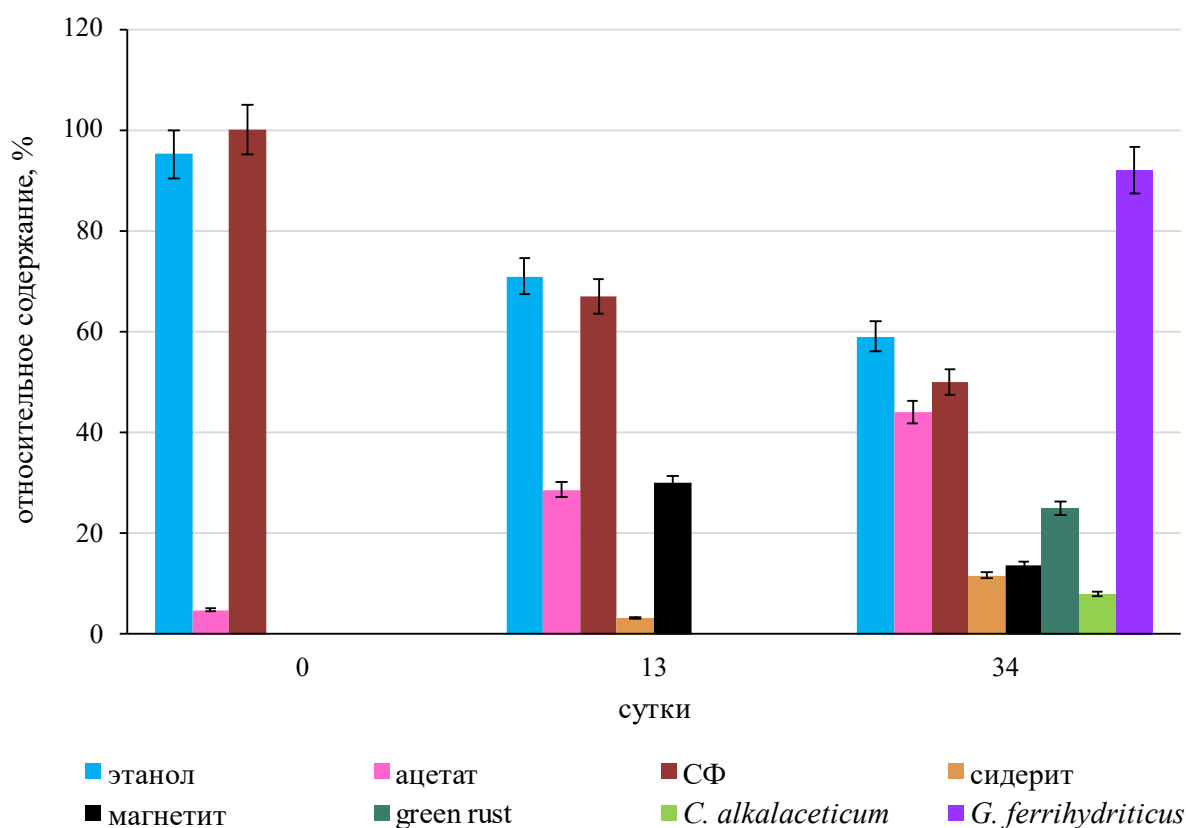


Рисунок 26. Графическое обобщение результатов экспериментов по росту с *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* синтезированным ферригидритом. Все данные выражены в процентах.

Таблица 9. Относительные значения интенсивности спектров, соответствующих различным позициям атомов железа в железосодержащих минералах, образовавшихся при росте *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* с синтезированным ферригидритом.

Время инкубации	СФ	сидерит	магнетит/ маггемит	Fe(III) в решетке green rust	Fe(II) в решетке green rust
0 сутки	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
5 сутки	66.9±1.1%	3.3±0.4 %	29.8±1.2 %	0 %	0 %
34 сутки	49.7±1.5%	11.6±1.9%	13.6±0.8 %	8.8±1.1 %	16.3±1.7 %

В контрольном эксперименте с пастеризованной бинарной культурой *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* не наблюдалось окисления этанола, накопления ацетата или трансформации ферригидрита. Чистая культура *G. ferrihydriticus* росла на среде с этанолом и ферригидритом, окисляя 6.8 ± 0.1 мМ этанола и продуцируя 20 ± 0.5 мМ Fe (II) и 6.5 ± 0.2 мМ ацетата.

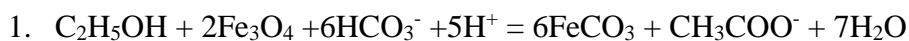
Синтрофные взаимодействия в щелочных средах, к которым относятся содовые озера, отличаются от таковых в нейтральных условиях, поскольку как межвидовой перенос электрона, так и энергетические процессы, связанные с окислением/восстановлением железа, в большой степени определяются рН. Прямое влияние рН обусловлено изменениями в химической активности протонов и применимо к реакциям, в ходе которых потребляются или образуются протоны. Косвенное влияние рН обусловлено контролем активности химических компонентов, участвующих в химических реакциях, осуществляемых микроорганизмами. Поэтому для интерпретации полученных результатов было важно провести термодинамические расчеты для условий проводимого эксперимента, что было осуществлено на кафедре геохимии МГУ им. М.В. Ломоносова д.г.-м.н. А.Ю. Бычковым.

Микроорганизмы развиваются в Eh-pH поле стабильности продуктов их метаболизма и поле метастабильности субстратов (Заварзин, 1972). Таким образом, сценарий роста синтрофной культуры в присутствии железосодержащих минералов определяется термодинамической стабильностью этих минералов. Проведенные расчеты показали, что условия эксперимента соответствовали полю устойчивости магнетита и метастабильности ферригидрита, что обуславливало начало роста *G. ferrihydriticus* в соответствии с реакцией:



$$\Delta G^\circ_r = -304.5 \text{ кДж/моль}; \Delta G^{exp}_r = -358.5 \text{ кДж/моль}$$

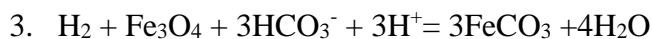
Важно отметить, что эта реакция более выгодна в щелочных условиях, чем при нейтральных значениях pH. Накопление магнетита на поверхности ферригидрита, по-видимому, затрудняло доступ *G. ferrihydriticus* к Fe(III) и, таким образом, снижало энергетическую эффективность восстановления ферригидрита. *G. ferrihydriticus* способен использовать H₂ или ацетат в качестве доноров электронов при восстановлении железа. Однако рассчитанное термодинамическое равновесие показало, что дальнейшее восстановление магнетита выгодно только в случае неполного окисления этанола:



$$\Delta G^\circ_r = -309.1 \text{ кДж/моль}; \Delta G^{exp}_r = \mathbf{-6.4 \text{ кДж/моль}}$$



$$\Delta G^\circ_r = -573.6 \text{ кДж/моль}; \Delta G^{exp}_r = \mathbf{+84.4 \text{ кДж/моль}}$$



$$\Delta G^\circ_r = -178.4 \text{ кДж/моль}; \Delta G^{exp}_r = \mathbf{+45.8 \text{ кДж/моль}}$$

Результаты анализа новообразованных минеральных фаз, проведенные через 5 и 34 дня после начала инкубации методом Мёссбауэровской спектроскопии ясно показали, что увеличение количества сидерита и образование оксикарбонатов Fe(II)-Fe(III) (green rust), зафиксированное в конце эксперимента обусловлено дальнейшей трансформацией магнетита (Табл.9, рис. 26, 27), либо за счет дальнейшего восстановления магнетита *G. ferrihydriticus* при использовании этанола в качестве донора электронов, либо за счет использования электронов, произведенных *Ca. "C. alkalaceticum"*, посредством прямого их переноса через частицы магнетита или электрон-проводящие пилы. Стратегия переноса электронов также подразумевает способность *Ca. "C. alkalaceticum"* использовать магнетит в качестве акцептора электронов вместо протонов. Таким образом, после 13 дней культивирования и активного восстановления ферригидрита *G. ferrihydriticus* начинает конкурировать с *Ca. "C. alkalaceticum"* как за донор электронов (этанол), так и за акцептор электронов (магнетит) (Рис.26, 27, Табл. 9). Использование *G. ferrihydriticus* Fe(III), содержащегося в ферригидрите и магнетите в качестве акцептора электронов при окислении этанола, как ни странно, не исключило развития облигатного синтрофа *Ca. "C. alkalaceticum"* в совместной культуре, что существенно расширяет представления о межвидовых взаимодействиях у бактерий, поскольку допускает использование вторичным анаэробом не только продуктов жизнедеятельности органотрофа (водород), но и исходного субстрата.

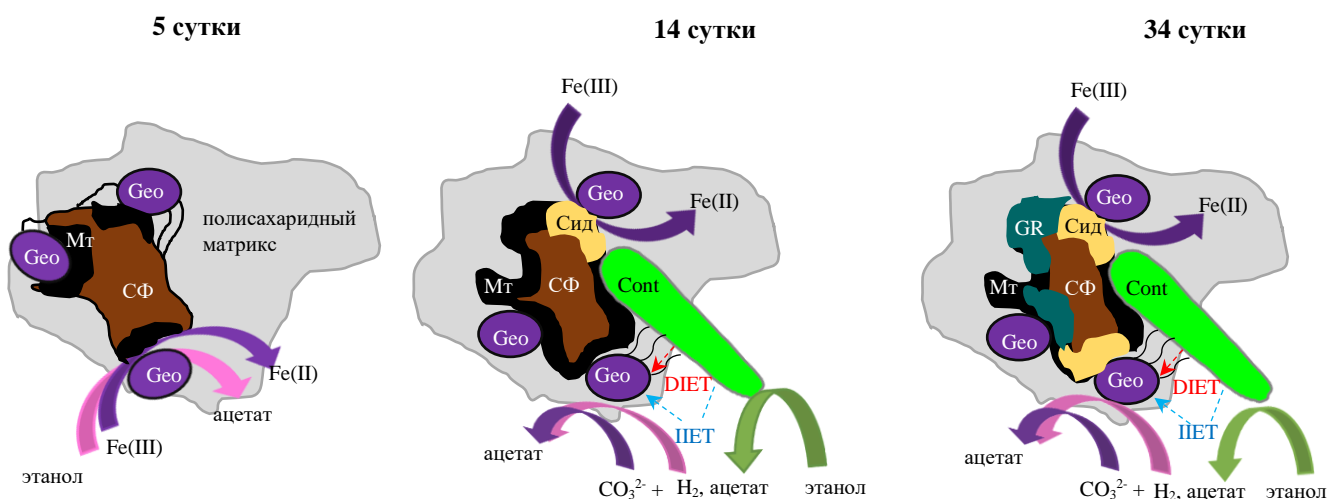


Рисунок 27. Схема, отображающая этапы развития синтрофной культуры *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* при росте на ферригидрите. Сокращения: Geo- *G. ferrihydriticus*; Cont - *Ca. "C. alkalaceticum"*; СФ-синтезированный ферригидрит; Мт – магнетит; Сид – сидерит; GR - оксикарбонаты Fe(II)-Fe(III); DIET- прямой межвидовой перенос электронов; ПИЕТ- не прямой межвидовой перенос электронов.

На основании проведенных экспериментов с чистой культурой алкалофильного железоредуктора *G. ferrihydriticus* и бинарными культурами, включающими этот организм, можно сделать некоторые обобщающие выводы. Так, исследования особенностей восстановления СФ *G. ferrihydriticus* показали, что, как и в случае нейтрофильных железоредукторов, образование новых минеральных фаз определяется физико-химическими условиями среды. Недостаток ферригидрита приводит к образованию более восстановленного продукта – сидерита, как в чистой, так и в бинарной культуре с *A. alkalilacustris*, а наличие дополнительных акцепторов или переносчиков электронов – AQDS или цитрата также способствует более интенсивному восстановлению СФ.

В то же время проведенные эксперименты с бинарными культурами выявили ряд интересных закономерностей роста *G. ferrihydriticus*, которые требовали дальнейших исследований. К таковым, прежде всего, относилось образование дополнительного количества ацетата, превышающее эквимолярное образование ацетата из использованного этанола, что заставляло предположить способность *G. ferrihydriticus* к ацетогенезу. Чтобы проверить возможность этого процесса были поставлены эксперименты как с чистой культурой *G. ferrihydriticus*, так и с бинарной культурой *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* без добавления ферригидрита.

4.5. Кинетика роста синтрофной культуры *Ca. "Contubernalis alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* на этаноле

Для определения возможности синтрофного взаимодействия *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* в отсутствие ферригидрита был проведен эксперимент, в котором в качестве акцептора электронов выступал карбонат-бикарбонатный буфер среды X_H (3-10 г/л), а субстратом служил этанол (20 мМ). В качестве посевного материала (5% об.) использовали культуру, полученную при росте на ферригидрите. Активный рост бактерий начался через 2 недели инкубации и сопровождался окислением этанола и выделением ацетата (Рис.28, Табл. 10). Среда оставалась прозрачной, но на дне флаконов наблюдалось образование тонкого слоя хлопьевидного осадка кремового цвета. Прямой подсчет клеток, произведенный после взбалтывания осадка, показал преобладание *Ca. "C. alkalaceticum"*, причем соотношение клеток этого облигатного синтрофа и *G. ferrihydriticus* после 19 дней инкубации составляло 10:1, т.е. было обратным наблюдаемому в экспериментах с ферригидритом. Исследование хлопьевидного осадка, проведенное путем сканирующей электронной микроскопии, подтвердило, что он содержал в основном клетки *Ca. "C. alkalaceticum"*, с редкими клетками *G. ferrihydriticus*, погруженными во внеклеточный полимерный матрикс. Конечное соотношение клеток *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus*, в культуре, растущей на этаноле

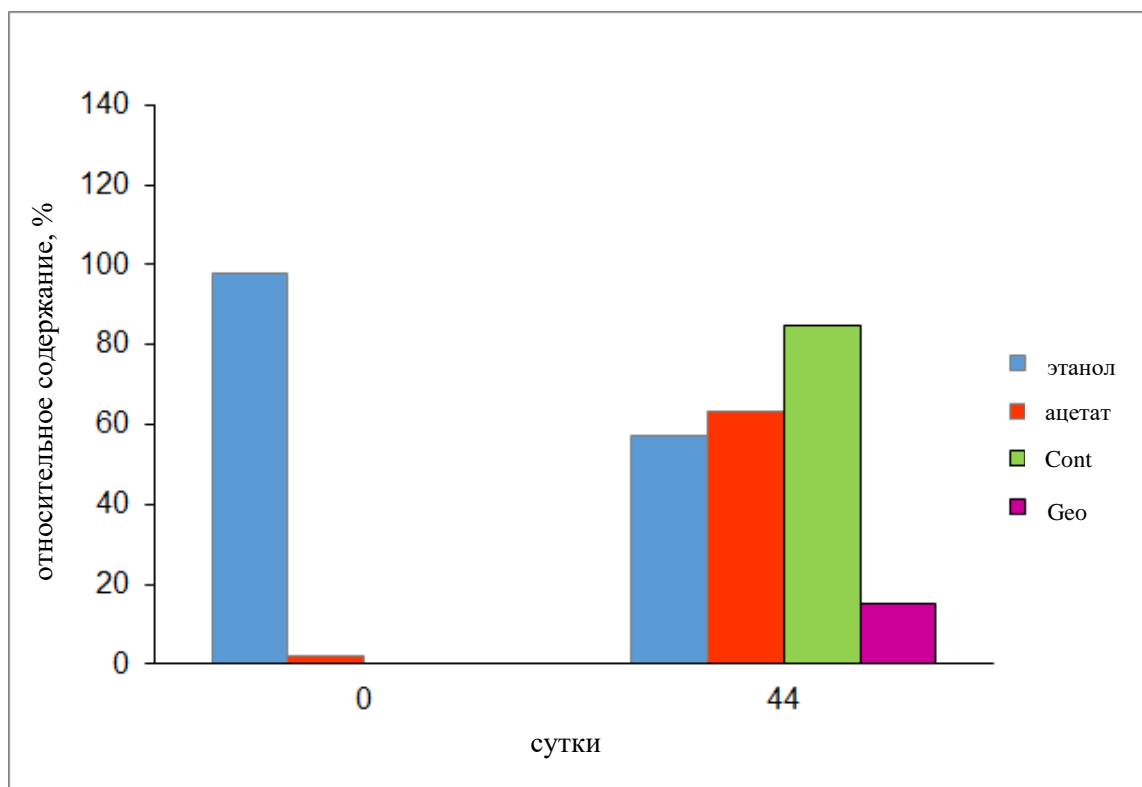


Рисунок 28. Графическое обобщение результатов экспериментов по росту *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* с этанолом. Все данные выражены в процентах.

в отсутствие ферригидрита, определенное методом высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК, составило 6:1 (Рис.28). К концу эксперимента было потреблено 41% от исходной концентрации этанола и произведено в 1.6 раза больше концентрации ацетата, рассчитанной по количеству потребленного этанола, поскольку при синтрофном росте это соотношение должно было быть 1:1. В то же время это соотношение было ниже 1:2, которое образуется при росте ацетогенов на этаноле.

Таблица 10. Рост *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* на среде с этанолом (средние значения со стандартными отклонениями).

сутки	этанол, мМ	ацетат, мМ	H ₂ , мМ	<i>Ca. "C. alkalaceticum"</i> , клетки/мл	<i>G. ferrihydriticus</i> , клетки/мл
0	33.8±1.5	0	<ПО	1±0.1×10 ⁵	1±0.5×10 ⁵
9	33.2±1.5	0	<ПО	3.5±2.1×10 ⁵	1.7±1.1×10 ⁵
19	32.1±1.4	0.4±0.2	0.2±0.02	4.5±0.4×10 ⁶	4.9±2.5×10 ⁵
29	26.1±1.8	7.6±3.4	0.1±0.02	5.0±0.7×10 ⁶	6.4±1.1×10 ⁵
35	20.5±2.5	19.2±2.8	<ПО	1.2±0.2×10 ⁷	2.5±1.7×10 ⁶
44	19.8±2.9	21.1±1.6	0.1±0.02	5.9±0.9×10 ⁶	2.0±0.2×10 ⁶

<ПО – ниже предела обнаружения

В контрольном эксперименте с пастеризованной бинарной культурой роста не наблюдалось. Чистая культура *G. ferrihydriticus* росла в этих условиях слабо (1.0×10⁶ клеток/мл) при времени удвоения 3.6 дня, формируя темный хлопьевидный осадок на дне флакона и образуя только 2-5 мМ ацетата в течение 30 дней инкубации. При дальнейших последовательных пересевах рост *G. ferrihydriticus* прекращался.

Попытки выделить *Ca. "C. alkalaceticum"* в чистую культуру методом 10-кратных разведений, учитывая обнаруженное преимущество в росте, также к успеху не привело, что еще раз подтвердило представление о облигатно-синтрофной природе этой бактерии.

Для доказательства способности *G. ferrihydriticus* использовать водород и карбонат в качестве донора и акцептора электронов был проведен дополнительный эксперимент. При концентрации водорода 100% об. или 25% об. в газовой фазе роста обнаружено не было, но клетки (5×10⁵ клеток/мл), по-видимому, функционировали, поскольку было зарегистрировано образование 2 мМ ацетата. Однако, при последующих пересевах образование ацетата на среде с водородом полностью прекратилось.

Мы использовали преимущественный рост *Ca. "C. alkalaceticum"* над *G. ferrihydriticus* на среде с этанолом для наращивания биомассы, с целью последующего выделения ДНК и получения генома этой бактерии для уточнения ее метаболических возможностей. В ходе экспериментов выяснилось, что поддержание роста бинарной культуры в периодических пересевах на среде с этанолом невозможно, поскольку к 6-му пересеву полностью исчезали клетки *G. ferrihydriticus* и прекращался рост *Ca. "C. alkalaceticum"*. Проведенные эксперименты указывали на то, что водород, скорее всего, не является донором электронов для *G. ferrihydriticus*, а синтрофный рост осуществляется, по-видимому, посредством механизма прямого переноса электронов, причем для его осуществления необходимо присутствие минералов железа.

4.5.1. Энергетический метаболизм "*Ca. C. alkalaceticum*"

Окисление этанола. В геноме "*Ca. C. alkalaceticum*" были обнаружены гены, кодирующие ферменты необходимые для двухэтапного окисления этанола. Мы предполагаем, что на первом этапе алкогольдегидрогеназа окисляет этанол до ацетальдегида, что сопровождается восстановлением NAD^+ до NADH . На втором этапе ацетальдегид окисляется до ацетата с помощью ацетальдегид:ферредоксин оксидоредуктазы; при этом происходит восстановление ферредоксина. Таким образом, в ходе двухэтапного окисления этанола до ацетата происходит образование NADH и восстановленного ферредоксина в соотношении 1/1.

Окисление ацетата. Анализ генома "*Ca. C. alkalaceticum*" выявил полный набор генов, которые кодируют все белки, необходимые для синтрофного окисления ацетата до CO_2 с образованием NADH и восстановленного ферредоксина. На первом этапе происходит активация ацетата до ацетил-КоА. Было показано наличие гена, кодирующего ацетаткиназу (*ackA*), и гены, кодирующие субъединицы АМР-образующей ацетат-КоА лигазы, которая катализирует превращение ацетата в ацетил-КоА через ацетил-АМФ, что позволяет заместить отсутствующую у бактерии фосфотрансацетилазу (Manzoor et al., 2018). На втором этапе происходит окисление ацетил-КоА до CO_2 с образованием восстановленного ферредоксина (СО-дегидрогеназная реакция) и NADH (метилен-ТГФ редуктазная, метилен-ТГФ дегидрогеназная и формиатдегидрогеназные реакции) через обращённый путь Вудал-Льюнгдаля. Большинство генов, кодирующих ферменты данного пути, были найдены в одном генном кластере, и лишь некоторые гены, кодирующие ферменты метильной ветви пути Вудал-Льюнгдаля, были обнаружены в других местах генома, вдали от основного генного кластера.

Механизм запасания энергии. Из вышесказанного следует, что ни при окислении этанола, ни при окислении ацетата у "*Ca. C. alkalaceticum*" не происходит запасания энергии посредством субстратного фосфорилирования (в случае ацетата происходит образование

одной молекулы АТФ в пути Вуда-Льюнгаля, но при этом затрачивается также одна молекула АТФ на этапе активации ацетата, поэтому энергия не запасается). По этой причине при росте на этаноле или ацетате запасание энергии может происходить только в ходе окислительного фосфорилирования за счёт работы ЭТЦ и АТФ-синтазы. На основе анализа генома мы предполагаем, что ЭТЦ у "*Ca. C. alkalaceticum*" представлена ферредоксин: NAD⁺ оксидоредуктазой (Rnf-комплекс), которая окисляет восстановленный ферредоксин, образовавшийся при окислении этанола и ацетата (см. выше), при этом происходит восстановление NAD⁺ до NADH и образуется электрохимический мембранный потенциал. Вспомогательную роль в формировании потенциала может играть мембраносвязанная пиррофосфатаза, которая гидролизует пиррофосфат образовавшийся на этапе активации ацетата.

Образование водорода и формиата. На заключительном этапе клетке необходимо окислить NADH, образовавшийся на вышеописанных этапах. В геноме "*Ca. C. alkalaceticum*" были обнаружены гены, кодирующие субъединицы [NiFe]-гидрогеназы. Мы считаем, что данная гидрогеназа окисляет молекулы NADH с образованием водорода. Образующийся водород может выступать в роли межвидового переносчика электронов между "*Ca. C. alkalaceticum*" и синтрофными партнерами. Важно отметить, что потенциально "*Ca. C. alkalaceticum*" может преобразовывать H₂ обратно в формиат уже вне клетки, используя обнаруженные периплазматические формиатдегидрогеназы, тем самым формиат также может выполнять роль межвидового переносчика электронов.

Таким образом, анализ генома позволил выявить полный набор генов, которые кодируют ферменты, необходимые для синтрофного окисления этанола и ацетата у *Ca. "C. alkalaceticum"*.

4.5.2. Геномный анализ способности *Ca. "C. alkalaceticum"* к внеклеточному переносу электронов

Проведенный анализ показал, что *Ca. "C. alkalaceticum"* обладает двумя различными путями внеклеточного переноса электронов к нерастворимым оксидам Fe(III): "классический" путь, управляемый цитохромом, описанный у различных микроорганизмов, использующих Fe(III) и другие нерастворимые акцепторы электронов, и механизм внеклеточного переноса электрона на основе флавина, недавно обнаруженный у патогенных и синтрофных грамположительных бактерий.

Первый путь у *Ca. "C. alkalaceticum"* определяется несколькими мультигеновыми цитохромами с-типа, связанными с восстановлением Fe(III), включая те, которые вовлечены во внеклеточное восстановление нерастворимых форм Fe(III). Они представлены четырьмя мультигеновыми цитохромами, главная из которых имеет одинаково слабую гомологию с

предполагаемыми терминальными Fe(III) редуктазами MtrA из *Shewanella oneidensis* и OmhA из *Carboxydotherrnus ferrireducens*, а также с цитохромом клеточной поверхности ОмсХ из *Geobacter sulfurreducens* (Shi et al., 2014; Gavrilov et al., 2021). Два другие мультигема гомологичны ранее описанным или предполагаемым хинол-окисляющим цитохромам. Дополнительный дигемовый цитохром у *Ca. "C. alkalaceticum"* не имеет гомологии с ранее описанными детерминантами внеклеточного переноса электронов, но гомологичен мультигемам неизвестной функции, обнаруженным у различных галофильных и щелочных бактерий.

Второй, флавиновый, механизм внеклеточного переноса электронов определяется у *Ca. "C. alkalaceticum"* гомологами NADH-дегидрогеназы нового типа Ndh2, кодируемой белком DmkB, участвующим в биосинтезе деметилменахинона (ДМК), мембраносвязанным электрон-переносающим ДМК-окисляющим белковым комплексом EatAB, его партнерами - электроноакцепторными липопротеинами FmnB и PplA и белковым комплексом FmnA-EcfA для выделения FAD. Согласно модели этого механизма внеклеточного переноса электронов, описанной для *Listeria monocytogenes*, он осуществляется путем серии переносов электронов от внутриклеточного NAD к мембранному пулу деметилменахинона, инициируемых Ndh2. Далее электроны передаются от ДМК к флавиновым группам, и, наконец, от восстановленных флавинов или секретируемых липопротеинов к терминальным внеклеточным акцепторам (Light et al. 2018).

4.5.3. Геномный анализ способности *G. ferrihydriticus* к литотрофному гомоацетогенезу

Анализ генома *G. ferrihydriticus*, депонированного в GenBank под номером JWJD000000 (Badalamenti et al. 2015), показал, что ацетат в *G. ferrihydriticus* может производиться из ацетил-КоА под действием фосфат-ацетилтрансферазы и ацетат-киназы, а углекислый газ может фиксироваться в обратимом цикле лимонной кислоты, полностью кодируемом геномом, включая основной фермент цикла - цитрат-лиазу. В то же время, в геноме *G. ferrihydriticus* отсутствовали ключевые гены пути Вуда-Льонгдаля, что ставило под сомнение возможность использования карбоната в качестве акцептора электронов этой бактерией.

ГЛАВА 5. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СМЕШАННОВАЛЕНТНЫХ МИНЕРАЛОВ ЖЕЛЕЗА АЛКАЛОФИЛЬНЫМИ АНАЭРОБАМИ В КАТАБОЛИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ В ЧИСТЫХ И БИНАРНЫХ КУЛЬТУРАХ

К смешанновалентным минералам железа следует отнести те, в кристаллическую решетку которых входят атомы как двух- так и трехвалентного железа. Наиболее значимым и распространенным минералом этой группы в литосфере является магнетит (Fe_3O_4), который иногда называют полуторным оксидом железа, поскольку его можно представить, как равную смесь оксидов закисного и окисного железа ($\text{FeO} \times \text{Fe}_2\text{O}_3$). Кроме того значимую роль в геохимии железа играют железосодержащие силикаты, прежде всего, класса слоистых силикатов, входящие в состав магматических, метаморфических и осадочных горных пород. Наиболее распространенными в природе представителями этого класса являются минералы группы слюд биотит $\text{K}(\text{Mg}, \text{Fe})_3[\text{AlSi}_3\text{O}_{10}](\text{OH}, \text{F})_2$ и глауконит $(\text{K}, \text{Na}, \text{Ca}) \times (\text{Fe}^{3+}, \text{Mg}, \text{Fe}^{2+}, \text{Al})_2(\text{Al}, \text{Si})\text{Si}_3\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \times \text{H}_2\text{O}$ (раздел 1.1.3). С точки зрения взаимодействия с хемосинтезирующими микроорганизмами эти минералы в равной степени могут служить, как донорами электронов, при переходе закисного железа в окисное, так и акцепторами электронов в случае восстановления окисного железа в закисное. При этом при низких значениях окислительно-восстановительного потенциала и при $\text{pH} \geq 8.0$ область стабильности этих минералов сравнительно небольшая. Это означает, что большую роль в трансформации этих минералов в сторону окисления или восстановления будут играть локальные условия среды.

5.1. Трансформация биотита и глауконита анаэробными алкалофилами

На момент начала исследований была известна только одна работа, посвященная возможности использования алкалофилами окисного железа, входящего в состав слоистых силикатов в качестве акцептора электронов. Из скважины, пробуренной в метаморфических породах Восточного Китая (Ляньюньган, провинция Цзянсу) Лиу с соавторами, выделили штамм CCSD-1, филогенетически близкий к *Anaerobranca gottschalkii* (уровень сходства по 16S рРНК 94.5%). В присутствии AQDS эта бактерия, используя дрожжевой экстракт и триптон в качестве субстратов, преобразовывала до 26.2% нонтронита ($\text{Na}_{0.72}(\text{Si}_{7.55}\text{Al}_{0.16}\text{Fe}_{0.29})(\text{Al}_{0.34}\text{Fe}_{3.54}\text{Mg}_{0.05})\text{O}_{20}(\text{OH})_4$), в результате чего наблюдалось образование плагиоклаза (Na-Ca полевой шпат) и иллита $(\text{Mg}, \text{Fe})_2\text{Al}_4\text{Si}_5\text{O}_{18}$ в качестве восстановленного железосодержащего минерала (Liu et al., 2015).

В качестве объекта исследования нами были выбраны биотит и глауконит, как наиболее распространенные железосодержащие слюды, при этом малоизученные в отношении использования их в качестве источника энергии для хемосинтезирующих микроорганизмов. В работе использовались отобранные кристаллы биотита $(K_{0.89}Na_{0.03})(Mg_{0.9}Fe^{2+}_{1.1}Al_{0.43}Fe^{3+}_{0.22}Ti_{0.09}Mn_{0.03})[Al_{1.26}Si_{2.8}O_{10}](OH,F)_2$ (Карелия, Россия) и глауконита $K_{0.8}(Mg_{0.4}Fe^{2+}_{0.1})(Fe^{3+}_{1.1}Al_{0.4})[(Si_{3.7}Al_{0.3})O_{10}](OH)_2$ (месторождение Маарду, Эстония) измельченные в порошок с размером частиц ≤ 50 мкм. Химический состав обоих минералов был определен методом рентгеновской флуоресцентной спектроскопии (XRF), а соотношение Fe^{3+}/Fe^{2+} с помощью Мёссбауэровской спектроскопии (Табл.11).

Таблица 11. Состав глауконита и биотита, использованных в экспериментах.

Оксиды, %	SiO ₂	Al ₂ O ₃	FeO*	Fe ₂ O ₃ *	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	TiO ₂	P ₂ O ₅	PF	Total
биотит	36.4	19.01	17.3	3.8	0.45	8.0	0.05	0.2	9.3	1.5	<0.01	4.0	100.0
глауконит	50.9	7.9	5.1	16.2	0.01	3.6	0.6	<0.01	8.3	0.1	0.05	7.2	100.0

* - данные Мёссбауэровской спектроскопии

В ходе экспериментов определяли продукты метаболизма, бактериальный рост, преобразование биотита и глауконита – методами рентгенодифракционного анализа, инфракрасной спектроскопии, Мёссбауэровской спектроскопии и СЭМ (раздел 2.5); Fe(II) экстрагируемое бн HCl и переход Si в раствор – колориметрически (раздел 2.4.1). Кроме того были проведены термодинамические расчеты взаимодействия биотита с водным раствором с использованием программы NCh (раздел 2.6). Для расчетов была выбрана 9-компонентная система (H-C-O-Na-Mg-Al-Si-Cl-K-Fe). Расчеты проводились для следующих экспериментальных условий: температура 35 °С, давление 1 бар, состав минеральной среды и биотита. Моделирование водно-минерального взаимодействия проводилось путем добавления в раствор небольших количеств биотита с шагом 1 мг/кг. Для глауконита такого рода расчеты не проводились, поскольку его термодинамические параметры не определены.

5.1.1. Трансформация биотита и глауконита *G. ferrihydriticus* в присутствии ацетата

Эксперименты проводили в оптимальных условиях роста железоредуктора на среде *Xn* (раздел 2.2) с ацетатом (10 мМ) в качестве донора электронов.

Количество клеток *G. ferrihydriticus* в супернатанте в течение всего периода эксперимента не превышало 10^5 клеток/мл. Однако микроскопия осадка, окрашенного

акридиновым оранжевым, показала, что в основном клетки железоредуктора были тесно ассоциированы с частицами минералов, образуя плотные колонии.

В течение первых дней эксперимента концентрация ацетата, добавленного в среду в качестве субстрата роста, не снижалась. Вместо этого наблюдалось образование примерно 3 мМ ацетата с обоими минералами (Рис.29а). Через 14 дней инкубации концентрация ацетата достигла максимума и стабилизировалась. Данные инфракрасной спектроскопии и рентгенодифракционного анализа показали, что инкубация с *G. ferrihydriticus* не оказала видимого влияния на структуру биотита. В случае глауконита, по данным рентгенодифракционного анализа, напротив, наблюдалось смещение пика (001) с 10.112 Å в стерильном контроле до 10.165 Å в эксперименте, по-видимому, связанное с увеличением числа слоев набухания в его структуре, что подтвердилось данными инфракрасной спектроскопии.

Мёссбауэровский спектроскопический анализ биотита и глауконита, проведенный в конце эксперимента, показал, что после 200 дней инкубации под воздействием *G. ferrihydriticus* оба минерала были частично трансформированы, результатом чего явилось образование новой магнитно-упорядоченной фазы (Рис.29б, Табл. 12). Спектры, снятые при 78 К, удовлетворительно описывались четырьмя квадрупольными дублетами, соответствующими ионам Fe(II) и Fe(III) в кристаллической решетке биотита и глауконита, и одного секстета, соответствующего новообразованной магнитоупорядоченной фазе, составлявшей 10.7% от общего числа атомов Fe в случае биотита и 16.2% в случае глауконита. Анализ параметров этого секстета показал, что магнитоупорядоченная фаза представляла собой смесь магнетита (Fe₃O₄) и маггемита (γ-Fe₂O₃) с расчетным диаметром частиц ~9 нм. Такой размер частиц и небольшое содержание магнитоупорядоченной фазы делали ее невидимой для рентгенодифракционного анализа. Подтверждением появления магнитоупорядоченной минеральной фазы было экстремальное увеличение магнитной восприимчивости: от 320 до ~6000×10⁻⁸ м³/кг в опыте с биотитом и от 60 до ~8000×10⁻⁸ м³/кг в опыте с глауконитом. Содержание кремнезема в растворе в ходе эксперимента было крайне низким (≤ 0.01 мг/л), но после окончания инкубации его концентрация в опытах превышала таковую в стерильном контроле, в случае с биотитом в 3 раза (97.7 мкМ) и почти на 40% в эксперименте с глауконитом (87.9 мкМ).

Проведенный различными методами анализ твердой фазы, показал, что *G. ferrihydriticus* способен использовать структурное железо, входящее в кристаллические решетки биотита и глауконита в катаболических реакциях с образованием новой

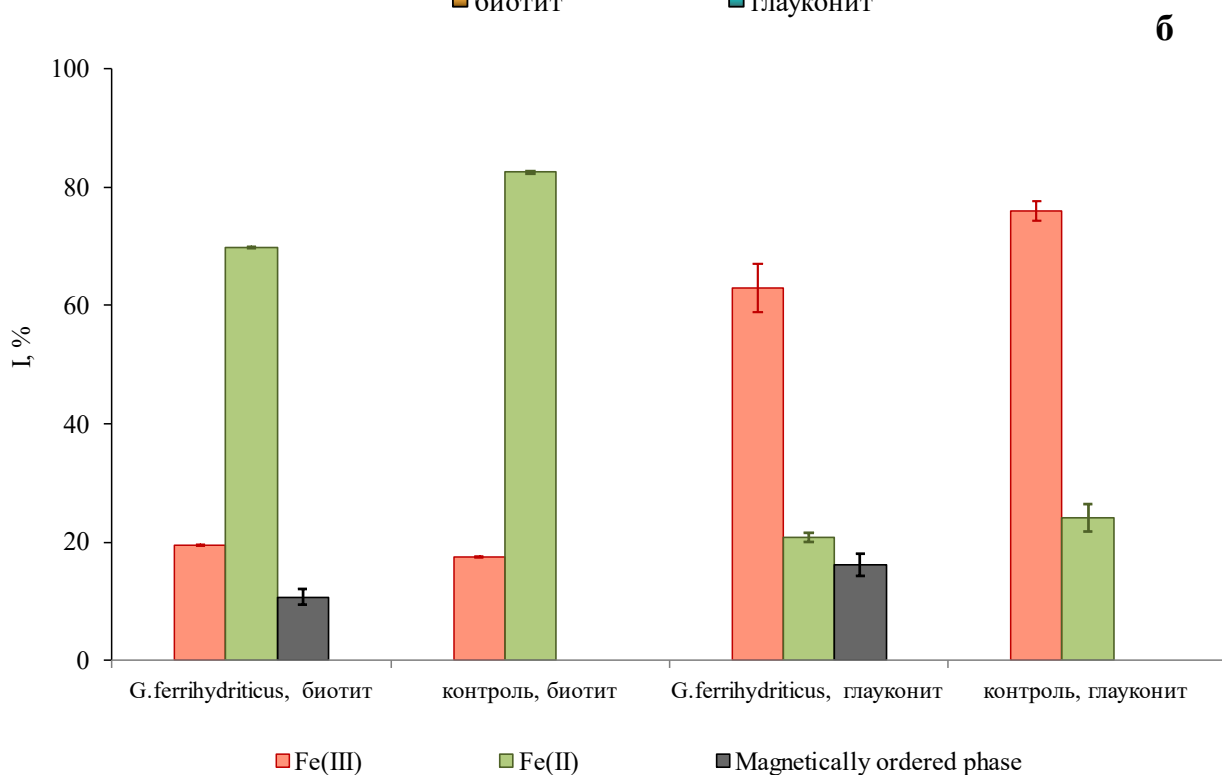
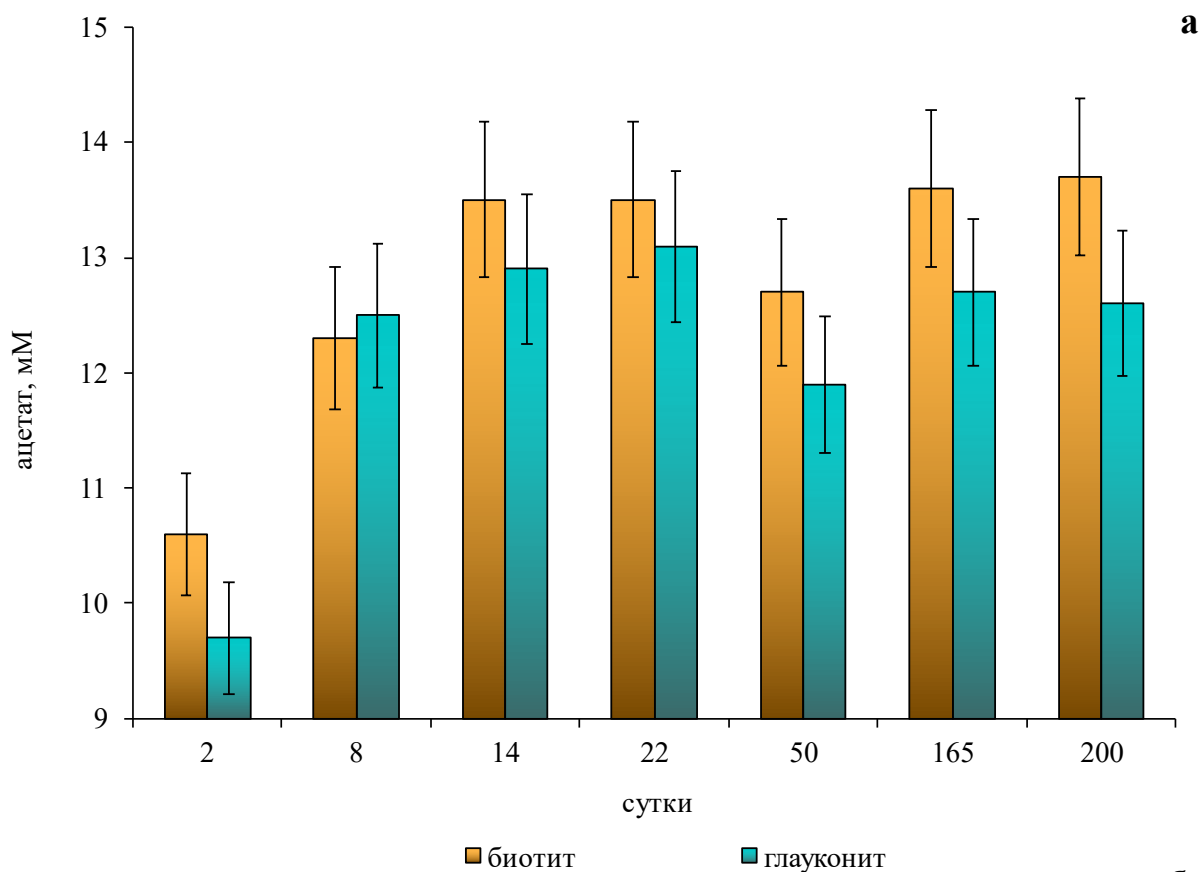


Рисунок 29. Увеличение концентрации ацетата в процессе роста *Geoalkalibacter ferrihydriticus* с биотитом и глауконитом (а). Образование магнитоупорядоченной фазы и изменение содержания атомов двух- и трехвалентного железа в биотите и глауконите по окончании эксперимента, определенное методом Мёссбауэровской (б).

Таблица 12 Относительные интенсивности Мёссбауэровских спектров, соответствующих позициям атомов Fe^{3+} и Fe^{2+} в кристаллической решетке слюд и магнитоупорядоченной фазы (МУФ) в контролях и опытах после 200 дней инкубации *G. ferrihydriticus*.

	$Fe^{3+}(M1)$, %	$Fe^{3+}(M2)$, %	$Fe^{2+}(M1)$, %	$Fe^{2+}(M2)$, %	МУФ, %
биотит контроль	8.8±0.2	8.7±0.2	64.4±0.8	18.1±0.7	0
биотит опыт	9.8±0.2	9.7±0.2	59.0±0.9	10.8±0.4	10.7±1.3
глауконит контроль	47.0±1.7	28.9±1.8	14.6±2.4	9.5±2.2	0
глауконит опыт	39.3±4.2	23.7±3.9	10.6±0.8	10.2±0.7	16.2±1.9

M1- транс-положение в октаэдрах; M2 - цис-положение в октаэдрах

магнитоупорядоченной фазы. При этом биотрансформация гидрослюд должна была приводить к образованию магнетита как в случае восстановления, так и окисления ионов железа, в связи с чем возникал вопрос: какое валентное состояние железа было использовано *G. ferrihydriticus* для роста в наших экспериментах?

Поскольку вероятность эффекта Мёссбауэра одинакова для атомов железа, находящихся в разных позициях кристаллической решетки, относительные интенсивности соответствующих спектров равны относительному количеству атомов железа в этих позициях. Анализ Мёссбауэровских спектров показал, что образование магнитоупорядоченной фазы сопровождается твердофазным перераспределением железа, сопровождающимся увеличением относительного количества всех атомов Fe^{3+} . Для биотита было зафиксировано увеличение относительной интенсивности спектров, соответствующих позициям, занимаемым атомами Fe^{3+} в дополнение к образованию магнитно-упорядоченной фазы. Увеличение количества Fe^{3+} для глауконита также наблюдалось, но в большей степени за счет образования большего количества магнитоупорядоченной фазы, что хорошо согласуется с особенностями кристаллической решетки этого минерала. Глауконит относится к группе гидрослюд и содержит в межслойном пространстве больше OH^- групп, приближаясь по своей структуре к смектитам. Такая структура, очевидно, является менее устойчивой к атаке *G. ferrihydriticus*, что приводит к более интенсивному разрушению этого минерала, по сравнению с биотитом. Таким образом, образование магнитно-упорядоченной фазы в экспериментах объяснялось скорее окислением Fe^{2+} , чем восстановлением Fe^{3+} .

Объяснить наблюдаемое образование дополнительного ацетата и уменьшение количества Fe^{2+} вместо ожидаемого увеличения, можно было только способностью

G. ferrihydriticus к анаэробному окислению Fe^{2+} при использовании его в качестве донора электронов, а карбоната в качестве акцептора электронов. В этом случае ацетат является результатом восстановления карбоната. Проведенный анализ генома *G. ferrihydriticus* не выявил у него наличие ключевых генов, ответственных за путь Вуда-Льонгдаля, обеспечивающего восстановление CO_2 в ацетат у классических ацетогенов (см. раздел 4.5.3), равно как и способности использовать водород в качестве донора электронов для осуществления этой реакции (раздел 4.5) Недавние исследования показали, что образование ацетата и пирувата концентрациях, близких к миллимолярным, возможно при химических реакциях металлов (Fe^0 , Ni^0 и Co^0) с CO_2 в воде. Реакции идут от нескольких часов до нескольких дней при давлении CO_2 1-40 бар и температуре от 30 до 100 °C (Varma et al., 2018). Кроме того, магнетит катализирует фиксацию CO_2 с помощью H_2 в воде при 100 °C и pH 8.0, то есть в щелочных водных условиях. Спектр продуктов включает формиат (до 200 мМ), ацетат (до 100 мкМ), пируват (до 10 мкМ), метанол (до 100 мкМ) и метан (Preiner et al., 2020). Таким образом потенциальная возможность неорганического синтеза ацетата в присутствии магнетита в щелочных условиях возможна, но требует вовлечения в реакцию водорода и повышенных температур. Образование дополнительного количества ацетата при росте *G. ferrihydriticus* наблюдалось нами и в экспериментах с бинарными культурами (см. разделы 4.2–4.4), что служит подтверждением наличия способности к ацетогенезу у *G. ferrihydriticus* в присутствии минералов железа, но требует серьезных дополнительных биохимических исследований.

Способность *G. ferrihydriticus* к анаэробному окислению железа нашла подтверждение при анализе его генома. Предполагается, что способность к окислению Fe^{2+} определяется наличием у бактерий субъединиц порин-цитохромного MtoABCD комплекса (Shi et al., 2012; Liu et al., 2012). Анализ генома *G. ferrihydriticus* показал наличие у него мультигенового цитохрома MtoA с-типа, располагающегося на мембране и окисляющего Fe^{2+} , а также хинон-окисляющего цитохрома MtoC, расположенного внутри мембраны. Первый фермент кодируется в кластере с двумя другими секретируемыми цитохромами, которые могут служить в качестве ретрансляторов электронов от MtoA к MtoC через периплазматическое пространство. Гомолог MtoC, обнаруженный у *G. ferrihydriticus* выполняет перенос электронов между пулом хинонов/хинолов во внутренней мембране и редокс-белками в периплазме. Ген mtoC в *G. ferrihydriticus* сгруппирован с генами комплекса Rnf и АТФ-синтазы типа F0F1. Комплекс Rnf может действовать как энергосберегающая ферредоксин: NAD^+ оксидоредуктаза (Biegel and Muller 2010; Biegel et al., 2011), соединяя восстановление NAD^+ с электрогенной перекачкой ионов Na^+ или H^+ через мембрану из

клетки. Таким образом, если вопрос биохимического механизма восстановления карбоната в ацетат у *G. ferrihydriticus* остается нерешенным, основные ферментные комплексы, которые должны связывать окисление Fe^{2+} с выработкой энергии, у него найдены и, более того, оказалось, что они кодируются одним и тем же генным кластером.

Для проверки принципиальной возможности получения энергии от окисления $Fe(II)$ в щелочных условиях мы провели термодинамические расчеты для экспериментальной системы с биотитом (Рис.30). Результаты термодинамических расчетов в высокой степени совпали с

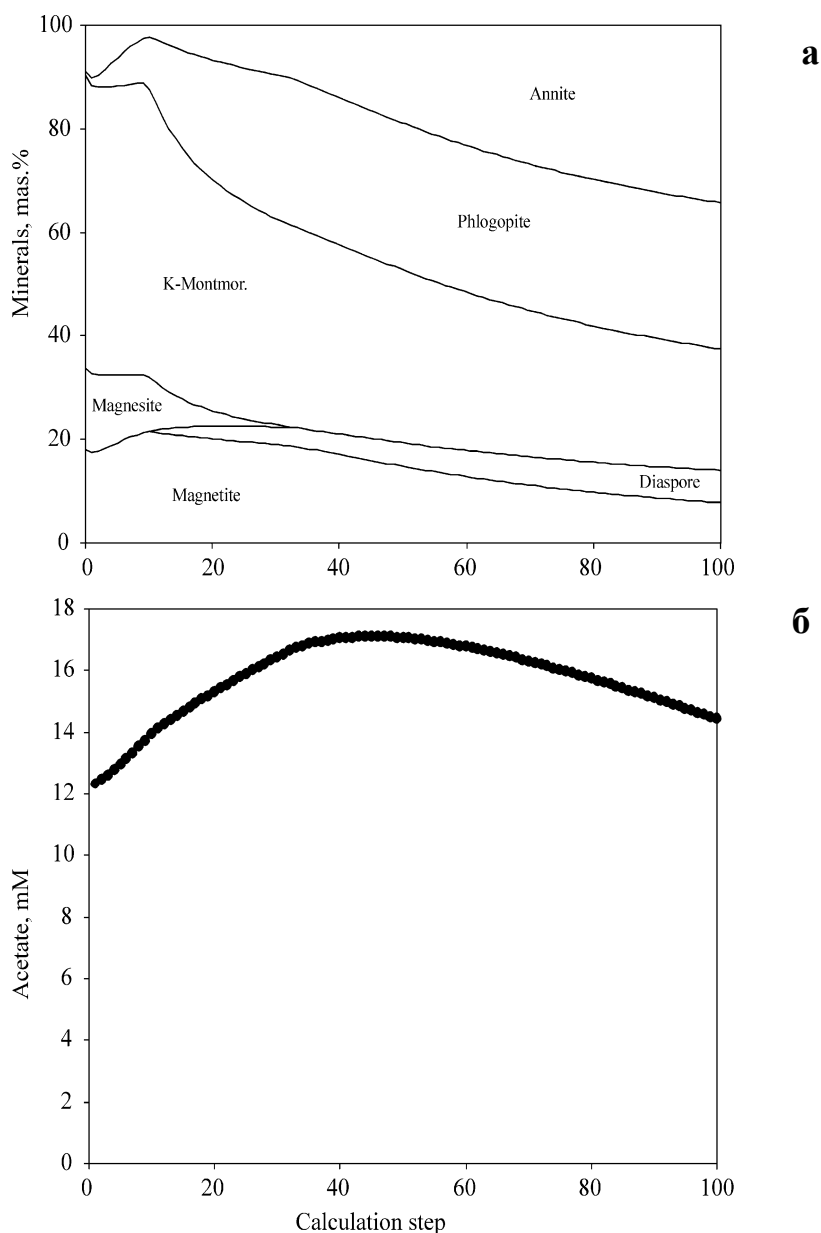


Рисунок 30. Результаты термодинамических расчетов, выполненных для экспериментальной системы с биотитом, демонстрирующие возможность одновременного образования магнетита (а) и ацетата (б).

экспериментальными данными. Они показали, что биотит является стабильной фазой при высокой концентрации ацетата. Согласно проведенным расчетам при постепенном добавлении биотита в раствор, железо окисляется до магнетита, в то время как расчетная концентрация ацетата сначала увеличивается с 12 до 17 мМ, а затем снижается, поскольку его присутствие определяется минеральными ассоциациями.

5.1.2. Трансформация биотита и глауконита в бинарной культуре *C. alkallicellulosi* и *G. ferrihydriticus* при разложении микрокристаллической целлюлозы

Целью эксперимента было выяснение возможности биотрансформации исследуемых слюд в случае развития двух бактерий, образующих простейшую трофическую цепочку целлюлозолитик - вторичный анаэроб, основанную на метабиотических взаимоотношениях. В отличие от чистой культуры *G. ferrihydriticus* в данном случае было возможно дополнительное воздействие на минералы со стороны целлюлозолитика, связанное с образованием органических кислот – формиата, ацетата и лактата (раздел 4.3). В качестве контрольного эксперимента был поставлен опыт с чистой культурой *C. alkallicellulosi* в присутствии минералов и без них. В ходе эксперимента использовались все методы оценки изменения бактериального роста, концентрации продуктов метаболизма и изменения минеральных фаз, что и в случае с чистой культурой *G. ferrihydriticus* (раздел 5.1.1).

Результаты трансформации силикатов бинарной культурой *G. ferrihydriticus* и *C. alkallicellulosi* оказались почти полностью идентичными результатам с чистой культурой *G. ferrihydriticus*, что являлось еще одним подтверждением ведущей роли диссимиляционных процессов в преобразовании железосодержащих минералов в щелочной области рН, по сравнению с опосредованным биологическим воздействием. Анализ Мёссбауэровских спектров показывает, что в случае биотита магнитоупорядоченная фаза образовалась в результате окисления Fe^{2+} (Табл.13, рис. 31). В случае с глауконитом данные не столь однозначны (Табл.13), поскольку суммарное соотношение между Fe^{3+} и Fe^{2+} до и после эксперимента практически не изменилось, хотя образование магнитоупорядоченной фазы было выше, чем в случае чистой культуры *G. ferrihydriticus* и составляло 24.3% против 16.2% (раздел 5.1.1.). Результаты, полученные по равновесной концентрации Si в растворе, оказались очень близкими к результатам, полученным для чистой культуры *G. ferrihydriticus*, что свидетельствуют о том, что механизм действия *G. ferrihydriticus* на биотит и глауконит в обоих экспериментах был сходным. В ходе эксперимента наблюдалось увеличение концентрации ацетата и этанола при практически не меняющихся концентрациях формиата и лактата (Рис.31, 32).

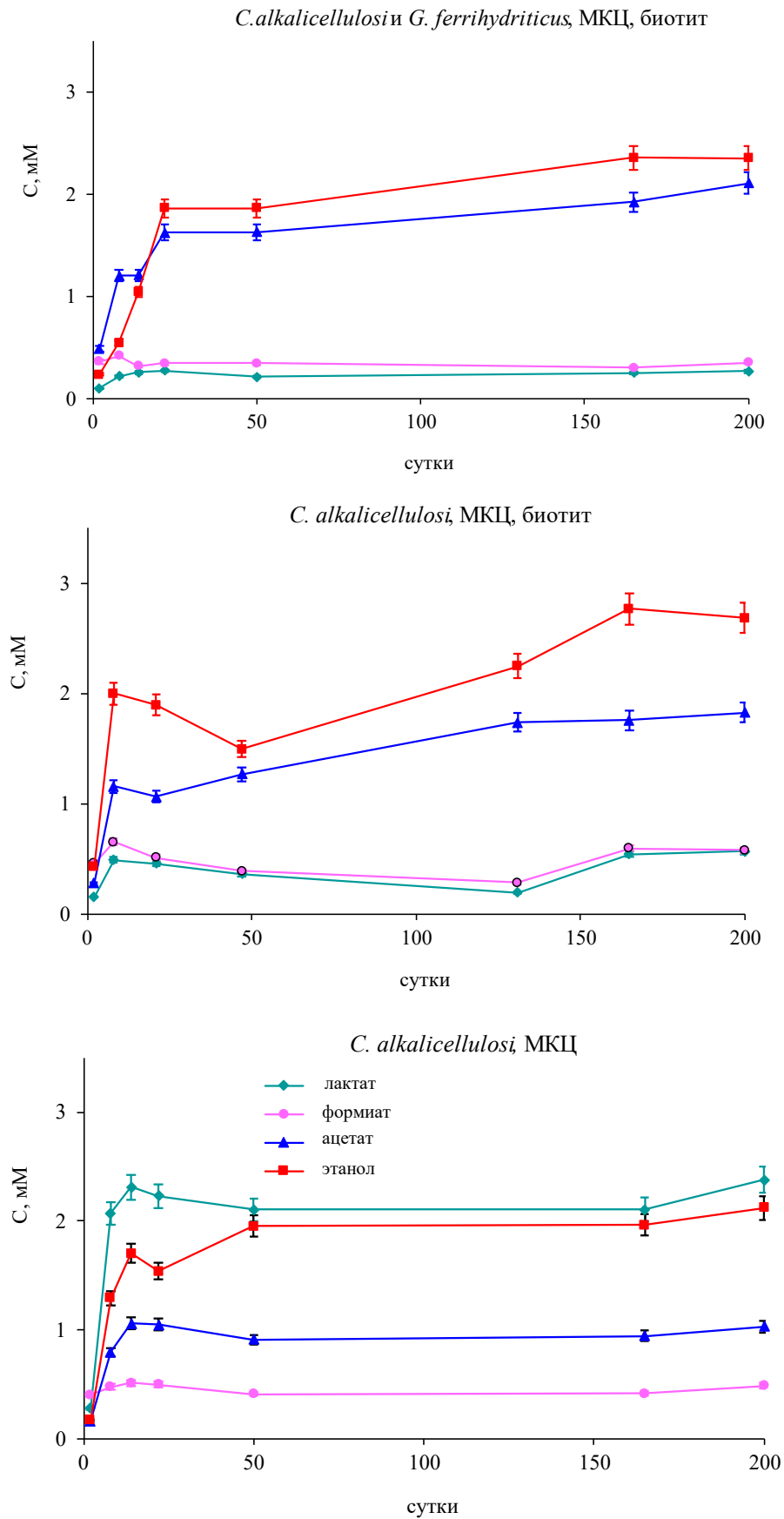


Рисунок 31. Продукты метаболизма, образуемые чистой культурой *C. alkallicellulosi* и совместно с *G. ferrihydriticus* при росте с биотитом и без минерала.

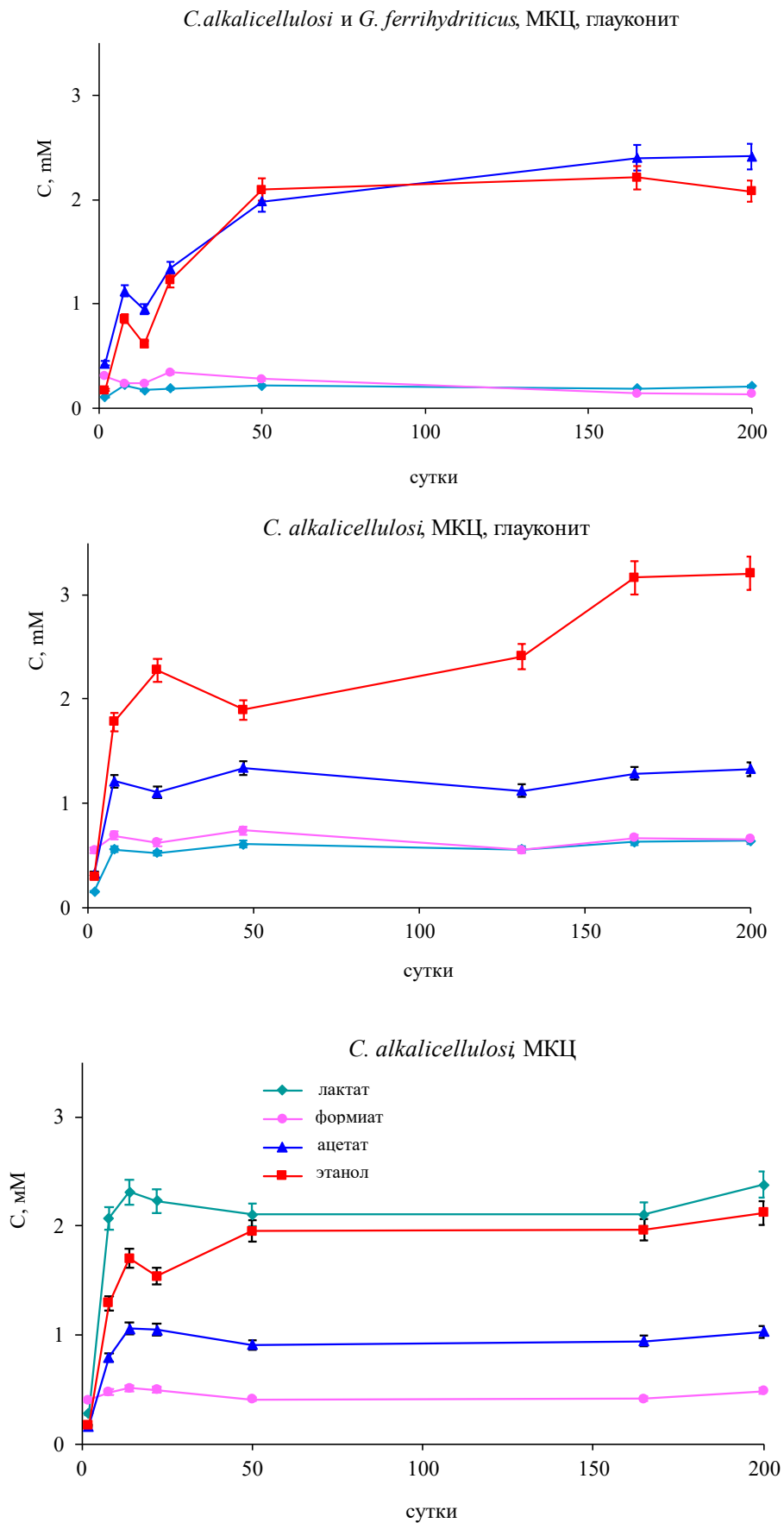


Рисунок 32. Продукты метаболизма, образуемые чистой культурой *C. alkallicellulosi* и совместно с *G. ferrihydriticus* при росте с глауконитом и без минерала.

Таблица 13 Относительные интенсивности Мёссбауэровских спектров, соответствующих позициям ионов Fe^{3+} и Fe^{2+} в кристаллической решетке слюды и магнитоупорядоченной фазы (МУФ) в контролях и опытах после 200 дней инкубации бинарной культуры *C. alkalicellulosi* и *G. ferrihydriticus*.

	$Fe^{3+}(M1)$, %	$Fe^{3+}(M2)$, %	$Fe^{2+}(M1)$, %	$Fe^{2+}(M2)$, %	МУФ, %
биотит контроль	8.8±0.2	8.7±0.2	64.4±0.8	18.1±0.7	0
биотит опыт	11.8±0.3	11.8±0.3	53.5±1.4	13.3±0.7	10.1±2.0
глауконит контроль	47.0±1.7	28.9±1.8	14.6±2.4	9.5±2.2	0
глауконит опыт	17.1±1.1	45.0±1.1	9.4±0.3	7.1±0.3	21.5±0.8

Поскольку *C. alkalicellulosi* – типичный органотроф, не способный к анаэробному дыханию, возможные пути его взаимодействия с силикатами были ограничены действием органических кислот, образующихся в качестве основных метаболических продуктов деградации МКЦ. Результаты наших исследований подтвердили, что в щелочных условиях этот фактор выветривания не имеет большого значения. Проанализированные различными методами в конце эксперимента биотит не отличался от такового в контроле, и только в опыте с глауконитом инфракрасный спектральный анализ выявил появление небольшого количества новообразованной фазы, представленной каолинитом $Al_2Si_2O_5(OH)_4$, что свидетельствовало об изменении структуры глауконита и объяснялось его более «рыхлой» кристаллической решеткой по сравнению с биотитом. Отсутствие Si в растворах, как в экспериментальных сериях, так и в контролях, скорее всего, связано с сорбцией кремнезема на поверхности МКЦ. Измерения растворимости чистых твердых фаз, отделенных от культуральной среды, отражали изменения в равновесной концентрации растворенного кремнезема и показали, что в случае *C. alkalicellulosi* микробное взаимодействие с силикатами даже ниже абиотического, что вызвано механическими барьерами, прежде всего слизью, образуемой *C. alkalicellulosi* в процессе деградации целлюлозы, или продукцией внеклеточных микробных полисахаридов, блокирующих реактивные центры на минералах. В то же время анализ продуктов метаболизма, накапливающихся при разложении МКЦ *C. alkalicellulosi* в присутствии и отсутствии биотита или глауконита, показал, что присутствие минералов изменяет соотношение продуктов, практически полностью подавляя образование лактата (Рис.31, 32). Одним из возможных объяснений этого необычного, но экологически значимого явления, заключается в том, что элементы со смешанной валентностью, входящие в состав исследуемых минералов, действуют как поглотители электронов, высвобождающихся в

процессе разложения МКЦ, в результате чего может снижаться продукция восстановленных соединений и изменяются конечное соотношение образующихся метаболитов.

5.2. Трансформация магнетита алкалофильными анаэробами

Магнетит - один из самых распространенных минералов железа на Земле, часто встречается в анаэробных условиях. Смешанная валентность Fe, содержащегося в магнетите, определяет его глубокую вовлеченность в биогеохимические процессы. Помимо непосредственного вовлечения в реакции хемосинтеза магнетит может использоваться микроорганизмами в процессах внеклеточного переноса электронов, поскольку особенности кристаллической решетки магнетита, а именно, спиновый дисбаланс между антипараллельными октаэдрической и тетраэдрической подрешетками железа, обуславливают ферримагнитные и высокие электропроводимые свойства этого минерала (Tsurkan et al., 2021), благодаря которым через него может осуществляться прямой перенос электронов между микроорганизмами при синтрофных взаимодействиях. Так, было показано, что частицы магнетита могут выступать посредниками при переносе электронов между пиями *Geobacter sulfurreducens* и донорами или акцепторами электронов (Kato et al., 2010, 2012a,b; 2013; Liu et al., 2015).

Выявленные нами особенности синтрофного взаимодействия в присутствии ферригидрита показали, что в присутствии с этанола как донора электронов магнетит может восстанавливаться алкалофильными железоредукторами до сидерита (см. раздел 4.4). При этом, поскольку процессы трансформации этих минералов в чистой культуре, могли существенно отличаться от таковых, происходящих в микробных сообществах, был исследован рост *G. ferrihydriticus* с магнетитом как в чистой, так и в бинарных культурах. До начала проведения наших исследований информация о возможной трансформации магнетита алкалофильными бактериями отсутствовала.

5.2.1. Трансформация магнетита *G. ferrihydriticus* в присутствии этанола

Термодинамические расчеты, выполненные ранее (раздел 4.4.2), показали, что восстановление магнетита в условиях эксперимента возможно в случае неполного окисления этанола:



$$\Delta G^\circ_r = -309.1 \text{ кДж/моль}; \Delta G^{exp}_r = -6,4 \text{ кДж/моль}$$

Таким образом, в чистой культуре *G. ferrihydriticus* мы ожидали увидеть восстановление синтезированного магнетита с образованием сидерита и ацетата, как неполного продукта окисления этанола. В результате проведенных нами опытов оказалось, что, действительно, *G. ferrihydriticus* способен использовать магнетит (исходное количество Fe(II) 10 мМ) в качестве акцептора электронов. Численность клеток к стационарной фазе роста достигала 5×10^7 кл/мл, а концентрация окисленного этанола составляла до 5 ± 0.5 мМ и сопровождалась образованием 6.0 ± 0.8 мМ ацетата. Мёссбауэровские исследования показали, что в процессе роста образуется 6 ± 0.1 % сидерита. Медленный рост и относительно низкая численность бактерии по сравнению с ростом на синтезированном ферригидрите в аналогичных условиях можно объяснялась низким выходом энергии при восстановлении магнетита при щелочных значениях pH.

5.2.2. Трансформация магнетита синтрофной культурой *Ca. "Contubernalis alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* на этаноле

Эксперименты проводили при разных количествах синтезированного магнетита (с расчетной концентрацией Fe(II) 2, 10, 25 мМ) в присутствии 20 мМ этанола на среде *Xn* (раздел 2.2). В процессе эксперимента определяли изменение численности бактерий методом прямого счета клеток, окрашенных акридином оранжевым, а также молекулярными методами высокопроизводительного анализа гена 16S РНК и кПЦР; концентрации этанола и образуемого ацетата; концентрации закисного железа с феррозином; изменения в твердой фазе - методом Мёссбауэровской спектроскопии. Чтобы оценить межвидовые взаимодействия был проведен эксперимент с биопленками, в котором магнетит наносился на покровное стекло, заливался небольшим количеством среды с бинарной культурой и после инкубации высушивался и анализировался с помощью СЭМ.

В случае совместного роста с *Ca. "C. alkalaceticum"* *G. ferrihydriticus* мог окислять этанол в процессе диссимиляционного восстановления железа или участвовать в межвидовом переносе электронов в качестве партнера *Ca. "C. alkalaceticum"*. Результаты, полученные во всех трех сериях с различным начальным количеством магнетита, были сходными (Рис.33). На первой стадии наблюдалось увеличение числа клеток *G. ferrihydriticus*, сопровождающееся незначительным увеличением HCl-экстрагируемого железа, окислением 1-3 мМ этанола и образованием эквимолярного количества ацетата. Клетки *G. ferrihydriticus* располагались на частицах магнетита как единично, так и в виде плотных колоний (Рис.34а, б), что существенно затрудняло адекватную оценку их количества путем прямого подсчета клеток. Оценка численности этих двух бактерий методом кПЦР показала, что на данном этапе клетки *G. ferrihydriticus* составляли 87-97% от общего числа клеток в бинарной культуре. Очевидно, эта

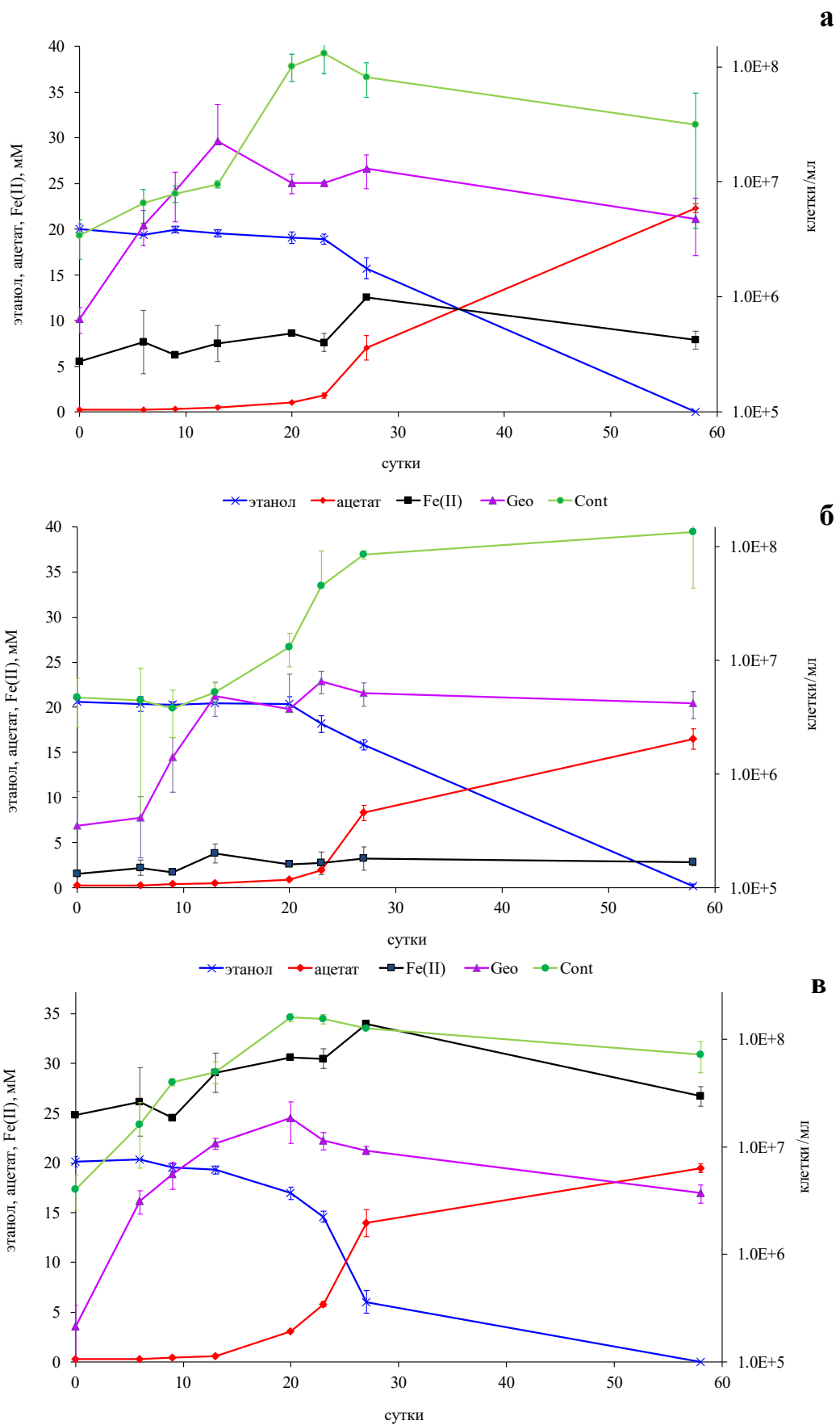


Рисунок 33. Кинетика роста бинарной культуры *Ca. "C. alkalaceticum"* (Cont) и *G. ferrihydriticus* (Geo) с разным количеством магнетита: (а) 2 мМ Fe(II); (б) 10 мМ Fe(II); (в) 25 мМ Fe(II).

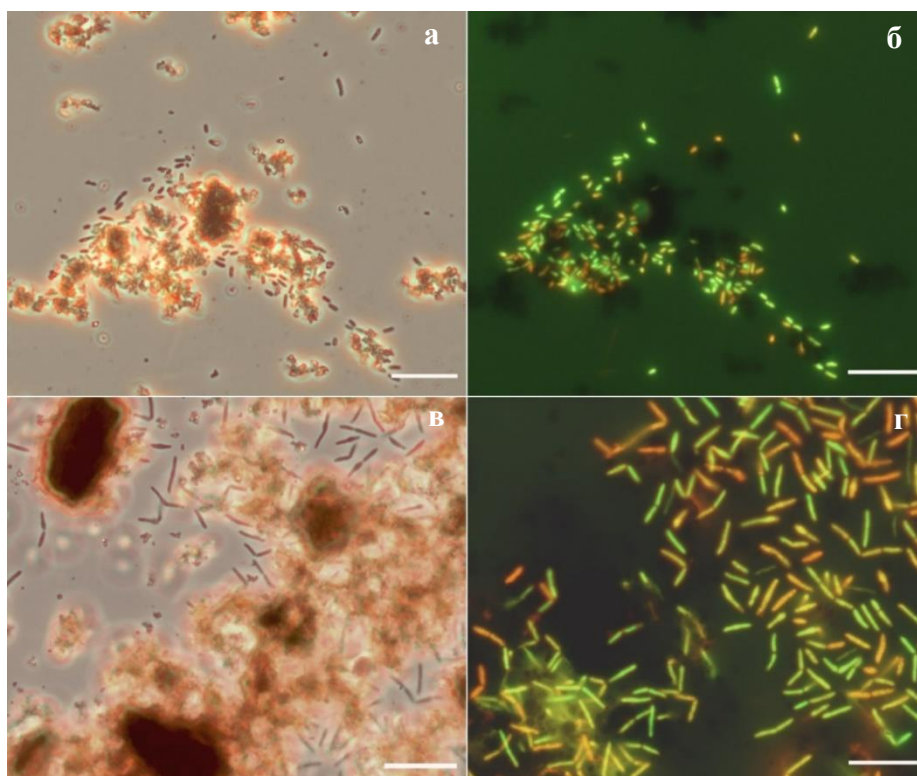


Рисунок 34. Микрофотографии бинарной культуры *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus*, растущих на магнетите с этанолом: (а, б) - через 23 дня инкубации преобладание клеток *G. ferrihydriticus* на частицах магнетита (а) фазовый контраст, (б) клетки, окрашенные акридиновым оранжевым; (в, г) - через 45 дней инкубации преобладание клеток *Ca. "C. alkalaceticum"* на частицах магнетита (в) фазовый контраст, (г) клетки, окрашенные акридиновым оранжевым. Масштабная линейка=10 мкм.

стадия соответствовала процессу диссимиляционного восстановления магнетита *G. ferrihydriticus*. Мёссбауэровский анализ твердой фазы, взятой после 23 дней инкубации, подтвердил процесс восстановления атомов Fe(III) и выявил наличие новообразованного сидерита в экспериментах с исходными количеством Fe(II) 5 и 10 мМ. В серии с максимальным исходным количеством магнетита (25 мМ Fe(II)) образование сидерита не было обнаружено, что, скорее всего, связано с недостаточной чувствительностью метода.

Следующий этап, наблюдаемый во всех трех вариантах исходных количеств магнетита, был связан с активным ростом *Ca. "C. alkalaceticum"*, сопровождающимся интенсивным окислением этанола и образованием ацетата. Клетки *Ca. "C. alkalaceticum"* также были неравномерно распределены в осадке и, как и *G. ferrihydriticus*, часто образовывали плотные колонии (Рис.34в, г). Численность синтрофной бактерии достигала 1×10^8 кл/мл, в то время как численность клеток *G. ferrihydriticus* на данном этапе практически не изменялась, как и не наблюдалось существенной разницы в изменении концентрации HCl-экстрагируемого закисного железа. В результате к концу эксперимента, по данным кПЦР анализа, клетки *Ca. "C. alkalaceticum"* составляли 60–85% от числа клеток бинарной культуры, а этанол был

полностью окислен (Рис.33). По данным Мёссбауэровского анализа, эта стадия в целом сопровождалась окислением железа и накоплением в качестве окисленной фазы маггемита и мелких магнитных наночастиц размером менее 10 нм, также представляющих собой смесь магнетита и маггемита. Контрольные эксперименты с пастеризованной культурой *Ca. "C. alkalaceticum"* показали, что она не способна расти в исследуемых условиях в отсутствие *G. ferrihydriticus*. В абиогенных контролях никаких изменений магнетита, сопровождающихся изменениями размеров его частиц или появлением новообразованных фаз методом Мёссбауэровской спектроскопии зафиксировано не было.

Исследование формирования биопленки на поверхности магнетита методом СЭМ позволило уточнить характер взаимоотношений между двумя бактериями (Рис.35). Было подтверждено неравномерное распределение бактериальных клеток по поверхности осадка и тенденцию к образованию плотных колоний. Клетки *Ca. "C. alkalaceticum"* составляли абсолютное большинство биопленки, тогда как клетки *G. ferrihydriticus* были представлены единичными клетками (Рис.35 в-г). Чрезвычайно интересно, что клетки обеих бактерий были связаны друг с другом и с поверхностью магнетита пилиями толщиной около 10 нм (Рис.35в,г). Гомолог электропроводящего пилина *Gba. sulfurreducens* (e-pilin GSU1496), идентифицированный в геноме *G. ferrihydriticus*, позволяет допустить продукцию высокопроводящих пилей и внешних мультигемовых цитохромов с-типа у *G. ferrihydriticus*. Что касается *Ca. "C. alkalaceticum"*, то анализ его генома выявил наличие у него полного набора генов для производства пилей IV типа, которые имеют высокий уровень сходства со жгутиками архей, были обнаружены у Грам-положительных и Грам-отрицательных бактерий и для которых в нескольких экспериментальных работах также была показана функция переноса электронов (Melville and Craig, 2013).

Обнаружение тесного контакта между клетками *G. ferrihydriticus*, *Ca. "C. alkalaceticum"*, и частицами магнетита, обеспечиваемого пилиями, а также наличие у обеих бактерий мультигемовых цитохромов является весомым аргументом в пользу предположения о том, что бактерии используют механизм прямого переноса электронов при синтрофном взаимодействии, причем магнетит может использоваться в качестве переносчика электронов, когда соотношение клеток увеличивается в пользу *Ca. "C. alkalaceticum"*. Обнаружение у *Ca. "C. alkalaceticum"* мультигемового цитохрома, имеющего гомологию с предполагаемыми терминальными Fe(III) редуктазами железоредукторов (MtrA из *Shewanella oneidensis* и ОмhA из *Carboxydotherrnus ferrireducens*, ОмсX из *Geobacter sulfurreducens*) означает, что железосооксиляющих бактерий, и, следовательно, имеет механизм принятия электрона. По-видимому, неспособность роста этой синтрофной культуры в отсутствии хотя бы следовых

количеств минералов железа объясняется невозможностью в этом случае активировать механизм прямой передачи электронов, через минералы железа и/или пили.

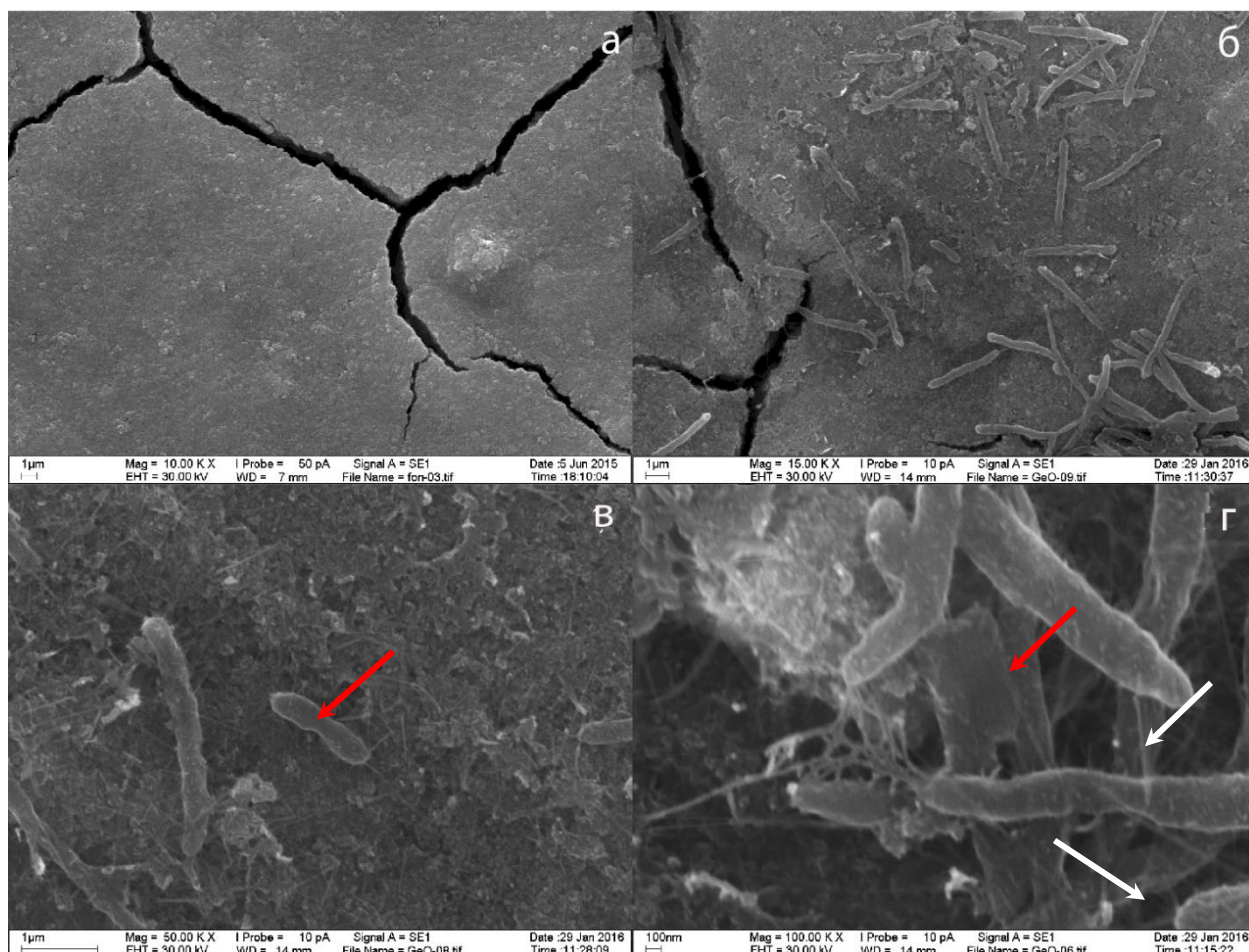


Рисунок 35. Микрофотографии контрольного абиогенного эксперимента (а) и биопленки (б-г), образованной бинарной культурой *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* (красные стрелки) на магнетите, выполненные при разных увеличениях. Белыми стрелками показаны пили, соединяющие бактериальные клетки между собой и поверхностью минералов.

Наиболее интригующим и требующим дальнейших исследований вопросом, появившимся в результате проведенных экспериментов, является вопрос о причине, по которой *G. ferrihydriticus* переключается с самостоятельного роста на магнетите на синтрофное взаимодействие с *Ca. "C. alkalaceticum"*, в результате которого численность последнего в конце инкубирования на порядок превышает численность железоредуктора. Возможным объяснением может быть то, что, как показали термодинамические расчеты, восстановление магнетита в исследуемых условиях – низкоэнергетический процесс то время, как синтрофное взаимодействие через прямой перенос электронов, вероятно, более выгодно. Начало роста *Ca. "C. alkalaceticum"*, по-видимому, невозможно, пока количество клеток *G. ferrihydriticus* не достигнет минимально необходимого уровня, способного обеспечить

эффективную передачу электронов. Важно отметить, что увеличение содержания маггемита ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) в осадке к концу эксперимента свидетельствует о том, что *G. ferrihydriticus* переключается с железоредукции на анаэробное окисление железа, сопровождающееся при этом образованием дополнительного количества ацетата.

Проведенные экспериментальные исследования биотрансформации смешанновалентных силикатов железа группы слюд (биотит, глауконит) и оксидов железа (магнетит), показали, что в щелочных условиях эти минералы могут быть с успехом использованы алкалофильными анаэробами как в качестве донора, так и в качестве акцептора электронов. Восстановленными фазами, образующимися при подобных трансформациях являются магнетит или сидерит, а в случае окисления - магнетит или маггемит. Исследования роста чистой культуры *G. ferrihydriticus* с биотитом и глауконитом подтвердили предполагаемую ранее способность этой бактерии к использованию карбоната в качестве акцептора электронов, приводящую к образованию ацетата в качестве восстановленного продукта, хотя биохимические пути этого процесса требуют дальнейших исследований. В качестве донора электронов *G. ferrihydriticus* использовал атомы двухвалентного железа, входящие в состав слюд. Эта способность подтверждается наличием в его геноме мультигемовых цитохромов, гомологичными MtoA, обнаруженными у анаэробных железooksисляющих бактерий. Проведенные опыты по культивированию с синтрофной культурой *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* с одной стороны подтвердили облигатную природу синтрофной бактерии *Ca. "C. alkalaceticum"* и неспособность ее к росту без партнера, с другой стороны выявили условия, при которых эта бактерия получает значительное преимущество в росте и способность к активному окислению этанола. Таким условием является присутствие магнетита, который в анаэробных щелочных условиях представляет собой устойчивую минеральную фазу, что означает, что его трансформация либо вообще невозможна, либо, как в случае с этанолом, дает очень небольшой выход энергии. С другой стороны, электропроводящие свойства этого минерала, наличие у диссимиляционных железоредукторов мультигемовых цитохромов, гомологичных железоредуктазам, а также способность к образованию пилей у *Ca. "C. alkalaceticum"*, по-видимому, делает возможным использование механизма прямого переноса электронов при взаимодействии с *G. ferrihydriticus*. Очевидно, что этот механизм дает преимущество в росте *Ca. "C. alkalaceticum"*, в том числе по сравнению с переносом электрона через водород, поскольку в случае совместного роста с гидрогенотрофными сульфатредукторами численность синтрофа всегда была на порядок ниже сульфатредуктора.

ГЛАВА 6. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИДЕРИТА И МЕТАЛЛИЧЕСКОГО ЖЕЛЕЗА АЛКАЛОФИЛЬНЫМИ АНАЭРОБАМИ В КАТАБОЛИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ В ЧИСТЫХ И БИНАРНЫХ КУЛЬТУРАХ

Проведенные нами исследования показали, что двухвалентное железо, входящее в состав смешанновалентных минералов железа, может использоваться анаэробными алкалофильными бактериями в качестве донора электронов. Однако исследованные минералы – биотит и глауконит, содержали относительно небольшое количество закисного железа, а возможность его окисления в магнетите не была очевидна из-за образования наночастиц, представляющих собой сложную смесь магнетита и маггемита. Сидерит (FeCO_3), является важнейшим и одним из наиболее распространенных минералов закисного железа на Земле, входящим в состав метаморфических и осадочных горных пород, первичным железосодержащим минералом железистых кварцитов. Простой состав делает его наиболее привлекательным объектом для исследования возможности использования закисного железа, в качестве донора электронов в реакциях хемосинтеза, осуществляемых алкалофильными анаэробными бактериями.

6.1. Анаэробное окисление сидерита *Fuchsiella ferrireducens*

Выявленный нами процесс анаэробного карбонат-зависимого окисления железа (раздел 5.1.1.), образующимся восстановленным продуктом которого являлся ацетат, давал повод предположить, что автотрофные алкалофильные ацетогены, обладающие путем Вуда-Льюнгаля для фиксации и восстановления карбонатов и способные к трансформации минералов железа, являются наиболее вероятными кандидатами к осуществлению такого процесса. Выделенная нами из осадков Танатарских содовых хемолитоавтотрофная ацетогенная бактерия *Fuchsiella ferrireducens* (раздел 3.2.3), обладала набором требуемых метаболических возможностей.

В ходе проведенных экспериментов с синтезированным ферригидритом, добавляемым в качестве акцептора электронов, удалось установить, что *F. ferrireducens* способна к одновременному использованию двух акцепторов электронов – карбоната и ферригидрита (раздел 3.2.3). Для выяснения способности этой бактерии анаэробно окислять закисное железо были проведены эксперименты на оптимальной среде *M*, с сидеритом гидротермального происхождения (20 г/л), в присутствии и отсутствии этанола (20 мМ) в качестве альтернативного закисному железу донора электронов. В экспериментах, где сидерит был единственным донором электронов, не было зафиксировано бактериального роста. В случае,

когда в среду кроме сидерита был добавлен этанол, наблюдался не только рост бактерии, но и заметное изменение окраски сидерита с коричневой на серую, что указывало на трансформацию этого минерала под воздействием бактерии. Мёссбауэровский спектр опытного образца показал образование дополнительного дублета, интенсивность спектра которого составляла $3.4 \pm 0.7\%$. При этом спектральный анализ не выявил изменений валентных состояний атомов железа, а сверхтонкие параметры новообразованной фазы соответствовали сидериту ($\delta = 0.978 \pm 0.032$ мм/с, $\varepsilon = 1.132 \pm 0.032$ мм/с), хотя незначительно отличались от исходного ($\delta = 1.23 \pm 0.01$ мм / с, $\varepsilon = 0.89 \pm 0.01$ мм / с), что и позволило выявить процесс образования новой фазы. В контрольном стерильном образце никаких изменений зафиксировано не было.

Проведенные эксперименты показали, что несмотря на подтвержденную способность исследуемой бактерии использовать карбонат в качестве акцептора электронов за счет пути Вуда-Льонгдаля, доказанной способности к диссимиляционной хемолитотрофной железоредукции (раздел 3.2.3) и потенциальной способности к анаэробному окислению железа, обусловленной присутствием в геноме этой бактерии мультигемовых цитохромов, являющихся компонентами железоредуктазного и железоокисдающего комплексов, *F. ferrireducens* оказалась неспособной к трансформации сидерита в отсутствие органических соединений (этанола). Зафиксированное образование небольшого количества новообразованного сидерита может быть обусловлено одним из двух процессов: (1) химической перекристаллизацией исходного сидерита под воздействием метаболитов (ацетата), выделяемых бактерией в процессе роста; (2) анаэробным окислением закисного железа в магнетит с последующим восстановлением его в сидерит с использованием этанола как донора электронов. Изменение окраски осадка является косвенным подтверждением второго сценария, а отсутствие зафиксированного Мёссбауэровской спектроскопией магнетита в качестве окисленного продукта может быть обусловлено его содержанием ниже уровня чувствительности метода.

6.2. Анаэробное окисление сидерита *Dethiobacter alkaliphilus*, штамм Z-1002

Для выяснения способности этой бактерии анаэробно окислять закисное железо были проведены эксперименты на оптимальной среде *M*, с сидеритом гидротермального происхождения (10 г/л), в отсутствие органики, за исключением раствора витаминов. Мёссбауэровский анализ сидерита выявил, что он содержит примесь оксидов железа (13%) и фужерита (10.6%) $[\text{Fe}^{2+}_4\text{Fe}^{3+}_2(\text{OH})_{12}][\text{CO}_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Trolard et al., 2007) – минерала группы зеленой ржавчины (Табл.14). После трех последовательных пересевов на этой среде, были сняты кинетические кривые бактериального роста, измерены органические метаболиты,

образующиеся в процессе роста, методами Мёссбауэровской спектроскопии оценены изменения, произошедшие в твердой фазе. Штамм Z-1002 устойчиво рос на среде в отсутствие каких-либо органических соединений. Максимальный выход клеток в этих условиях роста составил 10^7 клеток/мл и наблюдался после 34 дней инкубации (Рис.36). Мёссбауэровский

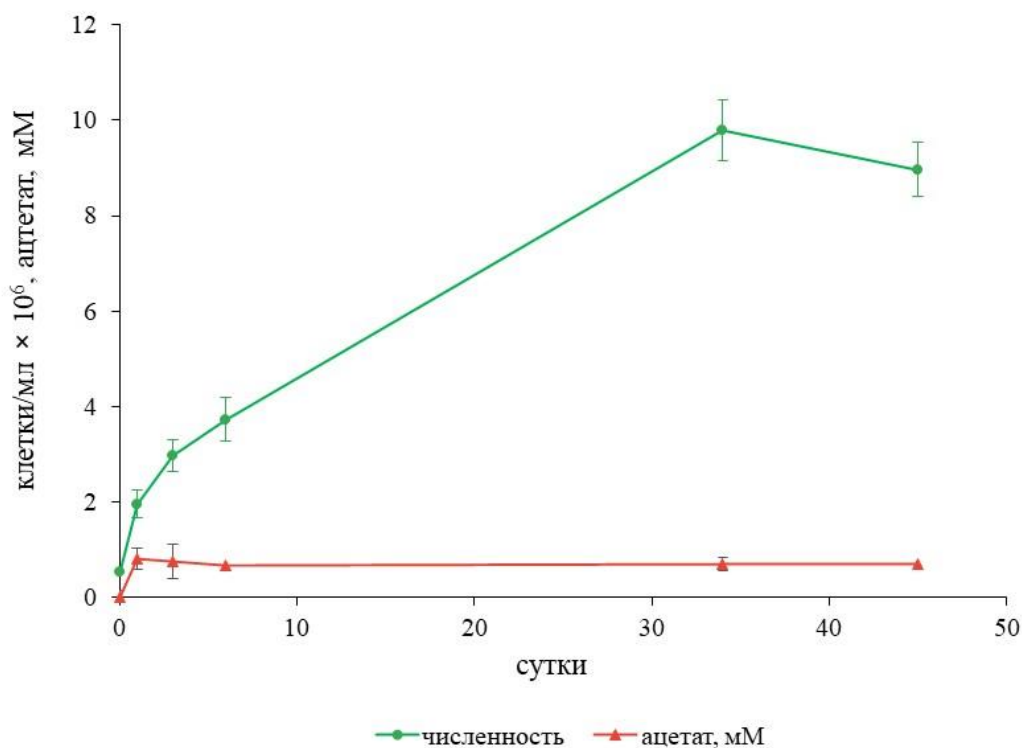


Рисунок 36. Кинетика роста *Dethiobacter alkaliphilus* штамм Z-1002 с сидеритом гидротермального происхождения.

анализ минералов, отобранных по завершении эксперимента на стационарной фазе роста и стерильных контролей показал снижение относительной суммарной интенсивности спектров, соответствующих атомам двухвалентного железа, с $87.7 \pm 2,9\%$ до $78.2 \pm 0,9\%$ в выросших культурах (Табл.14). В контроле таких изменений не наблюдалось. При этом относительная интенсивность спектра сидерита, подвергнувшегося микробному воздействию, практически не изменилась, но интенсивность дублета, соответствующего атомам Fe^{2+} в структуре фужерита, снизилась с $8.4 \pm 2.1\%$ до $2.1 \pm 0.6\%$, тогда как интенсивность дублета, соответствующего атомам Fe^{3+} в этой фазе, увеличилась с $2.2 \pm 0.5\%$ до $4.6 \pm 0.4\%$ (Табл.14), т.е. 75% атомов двухвалентного железа, содержащихся в фужерите, были окислены. В конце инкубации было зафиксировано увеличение содержания магнитно-упорядоченной фазы в минеральной смеси на 4.2%. Таким образом, с одной стороны, мы наблюдали перегруппировку атомов

Таблица 14. Относительные интенсивности парциальных спектров, соответствующих позициям ионов Fe³⁺ и Fe²⁺ в кристаллической решетке железосодержащих фаз в контролях и опытах после 45 дней инкубации *D. alkaliphilus* штамм Z-1002.

образцы	сидерит	фужерит		оксиды
		Fe ²⁺	Fe ³⁺	
опыт I, %	76.1±0.7	2.1±0.6	4.6±0.4	17.2±0.4
контроль I, %	76.3±2.0	8.4±2.1	2.2±0.5	13.0±0.4

двухвалентного и трехвалентного железа в фужерите, а с другой стороны, увеличение количества оксидов железа. Единственным метаболическим продуктом, зафиксированным в процессе роста штамма Z-1002 был ацетат, причем его концентрация была почти постоянной в течении всех фаз роста и колебалась в пределах 0.6-0.9 мМ (Рис.36).

Анализ генома штамма Z-1002 показал, что он обладает 2-мя генными кластерами, кодирующими мультигемовые цитохромы, которые могут составлять цепь внеклеточного переноса электронов между минералами Fe(II)/Fe(III) и пулом хинонов дыхательной цепи. Среди этих цитохромов есть как гомологи предполагаемых железоредуктаз MtrD-типа, так и гомологи железooksидаз MtoA-типа, а также гомологи вспомогательных мембранных цитохромов, участвующих в железоредукции у представителей *S. oneidensis* и *G. sulfurreducens* (Shi et al., 2014). Одновременное наличие у одного организма цитохромов, обеспечивающих как прямой, так и обратный внеклеточный транспорт электронов, встречается довольно редко. Интересно, что у штамма *D. alkaliphilus* Z-1002 имеются 4 гомолога предполагаемых железooksидаз MtoA, которые филогенетически кластируются с железоредуктазами этого и типового штаммов *D. alkaliphilus* АНТ1^Т и представляют собой ветвь белков, рано обособившихся от общих предков крупного кластера цитохромов DmsE. Протеомный анализ выявил схожий уровень экспрессии 9-ти мультигемовых цитохромов штамма Z-1002 как при восстановлении ферригидрита, так и при окислении сидерита. Среди таких белков оказались и гомологи железooksидаз MtoA. Небольшая, но достоверная разница в экспрессии (менее, чем в 2 раза) наблюдалась для одного из гомологов MtoA при железоредукции и гомолога поверхностного цитохрома SmhC при окислении сидерита. Цитохромами, детектированными только при окислении железа, оказались гомологи железоредуктазы OmhA термофила *Carboxydotherrmus ferrireducens* и сульфитредуктазы SirA. Эти белки филогенетически далеки друг от друга, но имеют структурное сходство. Тем не менее, ранее не было данных об их возможном участии в процессах окисления доноров электронов.

Полученные результаты, подтвердили способность *D. alkaliphilus* анаэробно окислять закисное железо в автотрофных условиях. Акцептором для *D. alkaliphilus* мог выступать либо карбонат, либо трехвалентное железо, входящее в состав фужерита и оксидов железа. Наличие у *D. alkaliphilus* пути Вуда-Люнгаля, а также железооксидаз допускало оба варианта. Проведенные кинетические эксперименты в сочетании с данными протеомного анализа указывают на то, что скорее акцептором электронов является именно трехвалентное железо.

6.3. Анаэробное окисление сидерита синтрофной культурой *Ca. "Contubernalis alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* на этаноле

Эксперименты проводили в 60-мл флаконах с оптимизированной средой *X_H* (30 мл) и с добавлением этанола (25 мМ) в качестве субстрата для облигатного синтрофа. В опытах использовали отобранные кристаллы сидерита гидротермального происхождения из Бакальского месторождения (Урал, Россия), перетертые в пудру с размером частиц <100 мкм; чистота сидерита была подтверждена методами рентгеноспектрального анализа и Мёссбауэровской спектроскопии. Порошок сидерита добавляли из расчета финального содержания Fe²⁺ 25 мМ. В процессе эксперимента следили за изменением численности бактерий методом прямого счета клеток с определением финального соотношения методом высокопроизводительного анализа участков гена 16S рРНК; также наблюдали за потреблением этанола и образованием продуктов метаболизма с помощью метода газожидкостной хроматографии; изменения твердой фазы определяли методом Мёссбауэровской спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии.

В проводимом нами эксперименте для *G. ferrihydriticus* было два альтернативных донора электронов – этанол и Fe²⁺, входящее в состав сидерита, а единственным возможным акцептором – растворенные карбонаты минеральной среды или нерастворимый карбонат кристаллической решетки сидерита.

Начало роста бинарной культуры *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* было зафиксировано по изменению цвета сидерита от оранжево-коричневого до темно-серого (Рис.37а). При этом лаг-фаза в разных повторностях занимала от 16 до 40 дней, после чего продолжительности дальнейших фаз роста практически не отличались друг от друга. Результаты, представленные на рисунке 38, нормализованы для наиболее быстрой лаг-фазы. Изменение цвета сидерита сопровождалось окислением этанола, образованием ацетата и увеличением концентрации клеток обоих микроорганизмов. В жидкой фазе количество клеток *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* начало увеличиваться одновременно, с постоянным соотношением 10:1 в течение всего времени инкубации (Рис.38). Клетки *Ca. "C. alkalaceticum"*

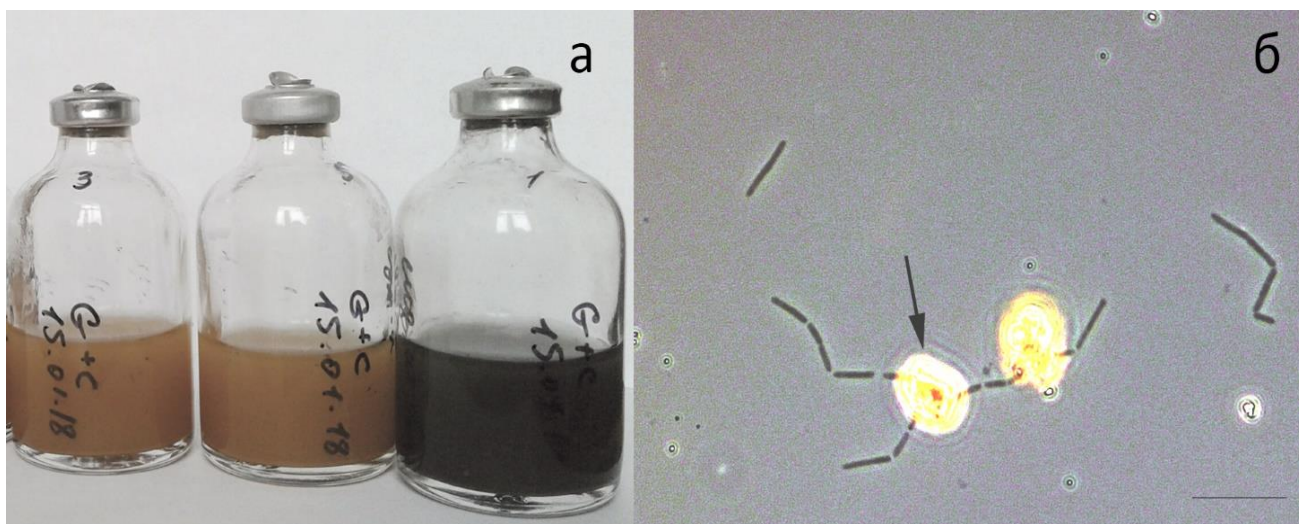


Рисунок 37. (а) Изменение цвета гидротермального сидерита под воздействием синтрофной культуры *Ca.* “*C. alkalaceticum*” и *G. ferrihydriticus*. (б) Фазово-контрастная микрофотография, демонстрирующая прикрепление клеток *Ca.* “*C. alkalaceticum*” к частицам сидерита. Масштабная линейка = 10 мкм

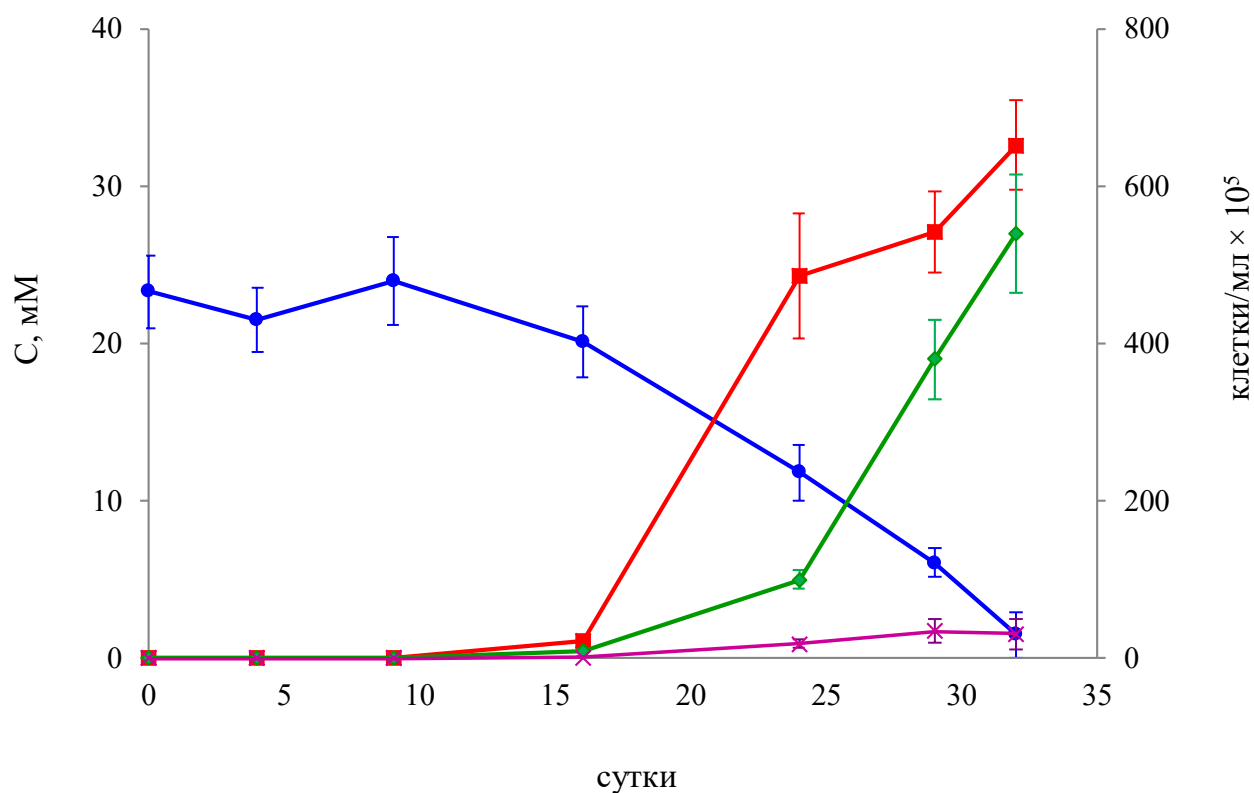


Рисунок 38. Кинетика роста синтрофной культуры *Ca.* “*C. alkalaceticum*” и *G. ferrihydriticus* на сидерите.

часто образовывали цепочки из 3-6 клеток каждая, прикреплявшиеся к частицам сидерита (Рис.37б). Результаты профилирования фрагментов гена 16S рРНК после окончания инкубации показали, что соотношение между клетками *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* составляет 32:1, что в целом подтверждало результаты прямого подсчета клеток. В конце эксперимента было израсходовано 21.8 ± 1.4 мМ этанола и образовано 32.6 ± 2.9 мМ ацетата. Таким образом, конечная концентрация ацетата в 1.5 раза превышала концентрацию, рассчитанную по количеству израсходованного этанола. Поскольку при синтрофном окислении этанола это соотношение должно составлять 1:1, дополнительное количество образовавшегося ацетата можно было отнести к результатам жизнедеятельности *G. ferrihydriticus*.

Мёссбауэровский анализ показал, что во время роста бактерий примерно 10% сидерита трансформировалось в новые фазы, содержащие атомы Fe(II) и Fe(III). По сравнению с абиогенным контролем, в спектрах опытных образцов было зафиксировано появление двух новых дублетов и секстета, соответствующих фужериту и магнетиту, доля которых варьировалась в разных повторностях. Общая интенсивность спектров, соответствующих атомам Fe(III) в минеральной фазе, составила около 4% (Табл.15), что однозначно указывало на процесс анаэробного окисления сидерита, не наблюдавшегося в стерильном контроле.

Таблица 15. Относительные значения интенсивности спектров, полученных методом Мёссбауэровской спектроскопии для контрольных и опытных образцов твердой фазы в экспериментах по синтрофному росту *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* с сидеритом.

Пробы	Сидерит FeCO ₃	Магнетит Fe ₃ O ₄	Фужерит [Fe ²⁺ ₄ Fe ³⁺ ₂ (OH) ₁₂] [CO ₃] ₂ ·3H ₂ O	
			Fe ²⁺	Fe ³⁺
контроль	100 %	0 %	0 %	0 %
Опыт 1	88.3 ± 1.5 %	1.2 ± 0.5 %	6.7 ± 1.5 %	3.8 ± 0.5 %
Опыт2	90.5 ± 0.4 %	5.2 ± 0.4 %	2.7 ± 0.1 %	1.6 ± 0.1 %

В контрольном эксперименте с пастеризованной культурой *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* не наблюдалось потребления этанола, образования ацетата и трансформации сидерита, что свидетельствовало о ведущей роли *G. ferrihydriticus* в этом процессе. Чистая культура *G. ferrihydriticus* росла на среде с этанолом и сидеритом, образуя 1-2 мМ ацетата. При этом окисления этанола не наблюдалось. Урожай клеток при этом составил $3.1 \pm 0.5 \times 10^6$

клеток/мл. Рост *G. ferrihydriticus* сопровождался такими же изменениями цвета сидерита, как и в эксперименте с синтрофной культурой, а Мёссбауэровский анализ показал образование примерно 5% магнетита. Таким образом, рост *G. ferrihydriticus* приводил к окислению сидерита в анаэробных условиях, сопровождающемуся образованием ацетата.

Рост синтрофной культуры с сидеритом определялся тремя факторами: термодинамической нестабильностью сидерита при щелочном pH (Рис.1), свойствами поверхности сидерита и количеством активных клеток *G. ferrihydriticus*, внесенных во флаконы при засеве. Теоретически в присутствии сидерита и этанола клетки могли одновременно осуществлять окисление этанола и закисного железа с карбонатом, как донором электронов. Однако, проведенные дополнительные эксперименты показали, что *G. ferrihydriticus* не способен к росту на среде с этанолом и растворенными карбонатами, добавленными в качестве донора и акцептора электронов. Таким образом, единственной возможной энергодающей реакцией, осуществляемой *G. ferrihydriticus* было анаэробное окисление сидерита до магнетита, реакция термодинамически невозможная в стандартных условиях, но энергетически выгодная в условиях эксперимента:



$$\Delta G^\circ_r = +573.6 \text{ kJ/mol}; \Delta G^{exp}_r = -84.4 \text{ kJ/mol}$$

Рост *G. ferrihydriticus* привел к окислению около 10% сидерита, но урожай клеток этой бактерии был невысок. В то же время присутствие сидерита способствовало росту облигатного синтрофа и привело к почти полному окислению этанола (Рис.38). В течение первых 24 дней инкубации скорость потребления этанола была такой же, как и в опытах без добавления минералов (раздел 4.5), т.е. за этот период было окислено 12.3 мМ этанола, а экономический коэффициент для *Ca. "C. alkalaceticum"* составил 8×10^6 клеток на 1 мМ потребленного этанола. После 24-го дня количество клеток облигатного синтрофа увеличилось, и этанол был полностью потреблен с пятикратно более высоким экономическим коэффициентом - 43×10^6 клеток на 1 мМ этанола. Учитывая неспособность *Ca. "C. alkalaceticum"* расти в чистой культуре с ферригидритом (раздел 4.4), магнетитом (раздел 5.2.2) или сидеритом, наиболее вероятным объяснением усиленного роста и метаболической активности на среде с сидеритом может быть увеличивающийся эффект от накопления электропроводящего магнетита, производимого *G. ferrihydriticus* и используемого либо в качестве дополнительного внешнего поглотителя электронов в процессе синтрофного окисления этанола, либо для прямого переноса электронов (раздел 5.2.2).

Таким образом, наши исследования синтрофных взаимодействий *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* в присутствии железосодержащих минералов разной степени окисленности позволило, во-первых, подтвердить способность *G. ferrihydriticus* к анаэробному окислению закисного железа и образованию ацетата в качестве восстановленного продукта, во-вторых, показать, что при механизме прямого переноса электронов между синтрофными партнерами облигатные синтрофы получают значительное преимущество по сравнению с механизмом непрямого переноса электрона через водород, что отражается на соотношении клеток синтрофа и бактерии-партнера, а также приводит к полному окислению исходного субстрата, в нашем случае этанола. Ключевым элементом, влияющим на этот процесс, является присутствие в среде электропроводящего магнетита, появление которого, по-видимому, стимулирует процесс перекачки электронов между микроорганизмами-партнерами и обеспечивается наличием у облигатного синтрофа *Ca. "C. alkalaceticum"* мультигемовых цитохромов-железоредуктаз, обеспечивающих сброс электрона на магнетит, а у *G. ferrihydriticus* мультигемовых цитохромов – железооксидаз, принимающих электроны либо с сидерита при его окислении, либо с магнетита при перекачке через него избыточных электронов от *Ca. "C. alkalaceticum"*. Этому процессу также способствуют пили, обнаруженные у обеих бактерий. Учитывая широкое распространение магнетита в природе, как в зоне гипергенеза, так и в осадочных, метаморфических и магматических породах можно предположить, что роль механизма прямого переноса электронов при синтрофных взаимодействиях может быть более существенной, чем классическая модель с водородом. Особенно значимым этот процесс может быть для подземной биосферы, где микроорганизмы существуют в тесной ассоциации с вмещающими породами. Обобщенная схема исследованных процессов синтрофного роста в присутствии окисленных и восстановленных минералов железа представлена на рисунке 39.

6.4. Анаэробная коррозия металлического железа под воздействием *G. ferrihydriticus*

Коррозия железа представляет собой серьезную экономическую и экологическую проблему. В то время как аэробная коррозия является в основном химическим процессом, коррозия железа, происходящая в аноксических условиях в основном вызвана деятельностью микроорганизмов (Dinh et al., 2004). Наиболее значимым результатом взаимодействия между поверхностью металла, абиотическими продуктами коррозии и микробными клетками являются локальные изменения в электрохимии на границе раздела металл-раствор, вызывающие необратимую трансформацию металлического железа (Herrera et al., 2009; Emerson, 2018).

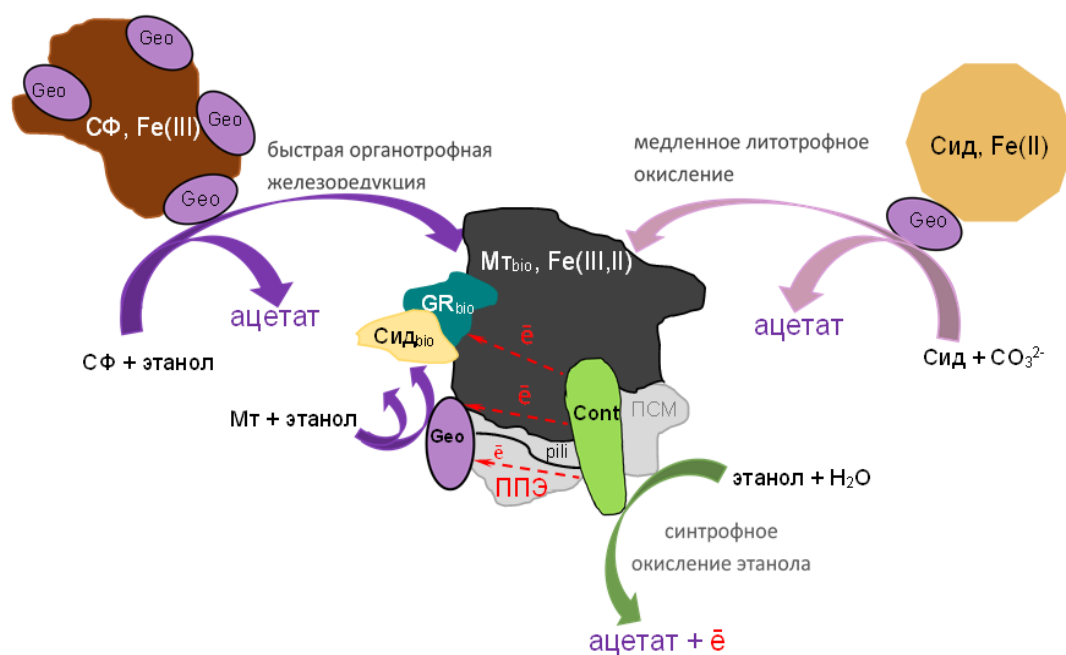


Рисунок 39. Обобщенная схема взаимодействия микробов и минералов в синтрофной совместной культуре *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus*. Сокращения: Geo - *G. ferrihydriticus*; Cont - *Ca. "C. alkalaceticum"*; СФ - синтезированный ферригидрит; Сид - гидротермальный сидерит; Сид_{био} - биогенный сидерит; МТ_{био} - биогенный магнетит; GR_{био} - биогенный фугерит; ПСМ - внеклеточный полисахаридный матрикс; ППЭ - прямой перенос электронов; большие стрелки - химические реакции, обеспечиваемые исследуемыми микроорганизмами; пунктирные стрелки - вероятные механизмы ППЭ между синтрофными партнерами: перенос электронов через электропроводящий магнетит; перенос электронов через электропроводящие пилы; ПСМ как переходная среда для переноса электронов через внеклеточные цитохромы.

Последние исследования показали, что наиболее разрушительное воздействие на металлическое железо оказывают микроорганизмы, способные к внеклеточному переносу электронов, поскольку за счет прямого поглощения электронов из металлического железа они стимулируют катодную реакцию на поверхности стали и, следовательно, ускоряют коррозию железа (Dinh et al., 2004; Mori et al., 2010, Kato 2016; Kato et al., 2015, 2016; Emerson, 2018). Так, было показано, что *Geobacter sulfurreducens* может непосредственно окислять Fe⁰, используя его как единственный донор электронов, а фумарат в качестве акцептора электронов, причем в этом процессе участвуют цитохромы с-типа OmcS и OmcZ, расположенные на внешней мембране (Tang et al., 2019).

Хорошо известно, что коррозия является рН-зависимым процессом и при значениях рН ≥ 9.0 ингибируется образованием пассивирующих пленок соединений железа. Эти пленки обычно состоят из гидроксидов, но в присутствии анионов, дающих менее растворимые соли железа, такие как карбонат, пассивирующие пленки могут содержать и сидерит (Reardon, 1995;

Eliyan and Alfantazi, 2014). Несмотря на то, что были описаны алкалофильные представители сульфидо-, метано- и ацетогенов, гидрогенотрофов и железоредукторов, то есть все метаболические группы, для которых была показана способность к биокоррозии при нейтральных значениях pH, информация о биокоррозии в щелочной среде очень ограничена: существует лишь несколько работ, в которых продемонстрирована способность алалофильных железо- и сульфатредуцирующих бактерий вызывать коррозию углеродистой стали (Tran Thi Thuy et al., 2020).

Для представителей рода *Geoalkalibacter* была показана способность к электрогенезу на аноде (Badalamenti et al., 2013; YoHo et al., 2015, Yadav et al., 2022) и сбросу электронов на катод (Cui et al., 2019). Кроме того, наши исследования наглядно показали, что *G. ferrihydriticus* может окислять железо, входящее в состав разных классов железосодержащих минералов (оксидов, карбонатов, силикатов), используя в качестве акцептора электронов карбонат; организм обладает комплексом мультигемовых цитохромов и пилей для осуществления этого процесса. Целью исследований было выяснить возможность использования им металлического железа в качестве донора электронов.

6.4.1. Характеристика и подготовка используемой стальной проволоки

Характеристика тонкой проволоки из стали (Emil Lux GmbH and Co. KG, Германия) была выполнена с помощью рентгеновской дифракции, рентгенофлуоресцентного анализа и Мёссбауэровской спектроскопии. Анализ дифрактограммы показал, что исследуемый образец представляет собой металлическое железо (α -Fe), а рассчитанный параметр решетки составил $a = 2.881 \pm 0.005 \text{ \AA}$. Полученное значение несколько больше, чем у чистой структуры α -Fe $2.866(5) \text{ \AA}$, что может свидетельствовать об образовании твердого раствора α -Fe и металла-примеси. Для определения металла, входящего в состав твердого раствора, был проведен рентгенофлуоресцентный анализ; было установлено, что примесным металлом в используемой для опытов проволоки является марганец. Мёссбауэровский спектр исходной стальной проволоки был получен при комнатной температуре и представлял собой два секстета с различными относительными интенсивностями. Наличие двух секстетов в Мёссбауэровском спектре можно объяснить различным ближайшим окружением атомов железа в структуре из-за присутствия марганца. Используя значение относительной интенсивности спектров и биномиальное распределение, была оценена концентрация примесных атомов в проволоке, что позволило определить химическую формулу твердого раствора $\text{Fe}_{0.98}\text{Mn}_{0.02}$.

Чтобы исключить влияние защитной органической дрессуры, обычно представляющей собой смесь глицерина и стеарата, которой покрывают проволоку при промышленном производстве, для исключения ее окисления, проволоку помещали в раствор этилового спирта и ацетона (1:1) и затем в ультразвуковую ванну на 30 мин при $T\ 40\ ^\circ\text{C}$, после чего трижды отмывали дистиллятом, высушивали фильтровальной бумагой и досушивали в термостате при $80\ ^\circ\text{C}$.

6.4.2. Условия эксперимента

В опыте использовали анаэробно приготовленную среду *Xn* (раздел 2.2.), лишенную восстановителей и содержащую 0.02 г/л дрожжевого экстракта в качестве фактора роста. Среду разливали под током N_2 (100%), по 40 мл в 120 мл флаконы, с 100 мг проволоки в каждом флаконе. После стерилизации среду засеивали супернатантом культуры *G. ferrihydriticus* (5% об.), выращенной на СФ с формиатом, чтобы избежать попадания минералов в раствор. Количество клеток *G. ferrihydriticus* в супернатанте составляло 2.5×10^6 клеток/мл. Флаконы инкубировались при $35\ ^\circ\text{C}$ в течение 120 дней. После первого пересева были проведены еще три последовательных пересева с инкубацией в течение 180 дней. В экспериментах использовали три варианта стерильных контролей: (1) стальная проволока в стерильной анаэробной среде; (2) стальная проволока в стерильной аэробной среде; (3) стальная проволока, обернутая вокруг тонкого платинового стержня в стерильной анаэробной среде. Контроли инкубировались одновременно с опытами при тех же условиях. Все эксперименты и контроли проводились в трех повторностях.

В экспериментах контролировали концентрацию H_2 и ацетата в течение всего периода инкубации. По окончании экспериментов численность *G. ferrihydriticus* оценивали с помощью анализа кПЦР. Биопленки *G. ferrihydriticus* на поверхности проволоки окрашивали ДНК-красителем SYBR Green и визуализировали с помощью конфокального лазерного микроскопа Leica. Морфологию и состав новообразованных минеральных фаз и структурные изменения проволоки исследовали методом сканирующей электронной микроскопии и Мёссбауэровской спектроскопии.

6.4.3. Рост *G. ferrihydriticus* в присутствии металлического железа

В первом пересеве в процессе инкубации цвет стальной проволоки постепенно менялся от металлического до черного (Рис.40а). Через 50 дней инкубации она покрылась пузырьками газа и всплыла на поверхность жидкой среды (Рис.40в), а к концу инкубации на дне флаконов образовался тонкий голубовато-зеленый осадок (Рис.40в). Единственным детектированным продуктом, образовавшимся в процессе роста *G. ferrihydriticus*, был H_2 , концентрация

которого к концу эксперимента достигла 9 мМ (Рис.41). Количество клеток в жидкой среде не превышало $3-5 \times 10^5$ клеток/мл, однако с помощью лазерной конфокальной микроскопии удалось выявить, что клетки *G. ferrihydriticus* в основном располагаются на поверхности стали, образуя полимерный матрикс, который существенно затруднял получение качественных снимков. Мёсбауэровские исследования образцов стальной проволоки и осадка, собранного после окончания эксперимента, показали, что в результате жизнедеятельности *G. ferrihydriticus*, образовалась смесь фужерита и сидерита, т. е. происходило окисление металлического железа и в двух-, и в трехвалентную форму.

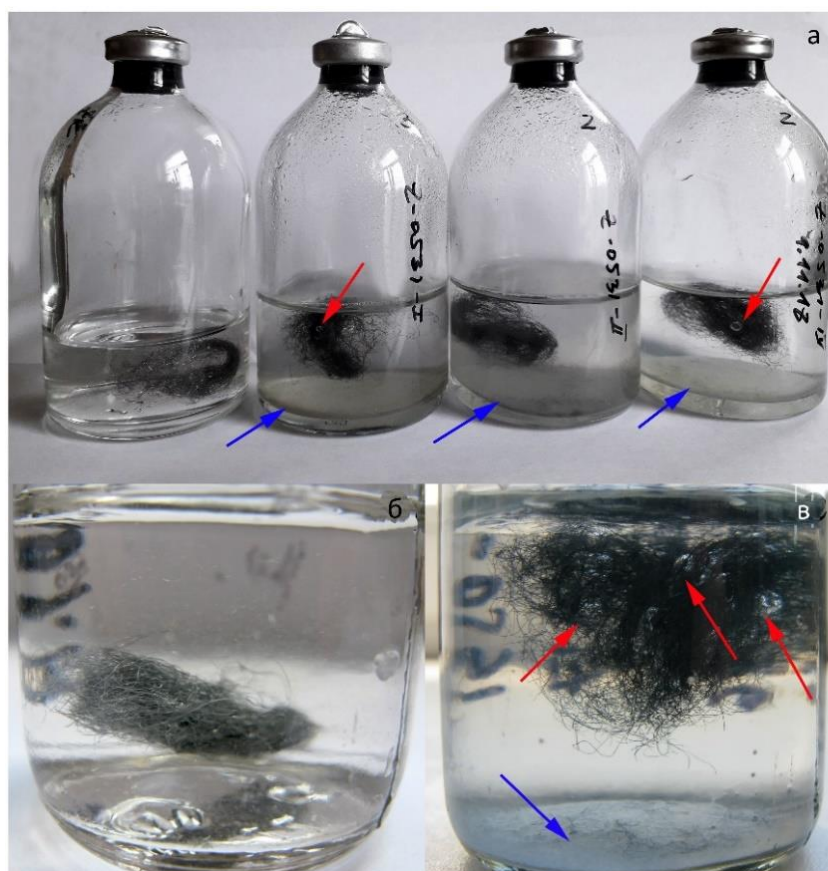


Рисунок 40. Изменение стальной проволоки, сопровождающееся почернением и образованием пузырьков газа (красные стрелки (а,в)) и осадка (синие стрелки (а,в)) после 180-дневного роста *G. ferrihydriticus*. Левый флакон (а,б) - стерильный контроль; правые три флакона (а) - три последовательных пересева.

Проведенные затем три последовательных пересева показали, что, хотя скорость коррозии замедлилась, процесс биокоррозии оставался стабильным (Рис.41). К концу экспериментов, в 4-м пересеве, образовалось 5.5-6.7 мМ H_2 . Количественный ПЦР-анализ показал, что число клеток *G. ferrihydriticus* на стальной проволоке и в жидкой среде не

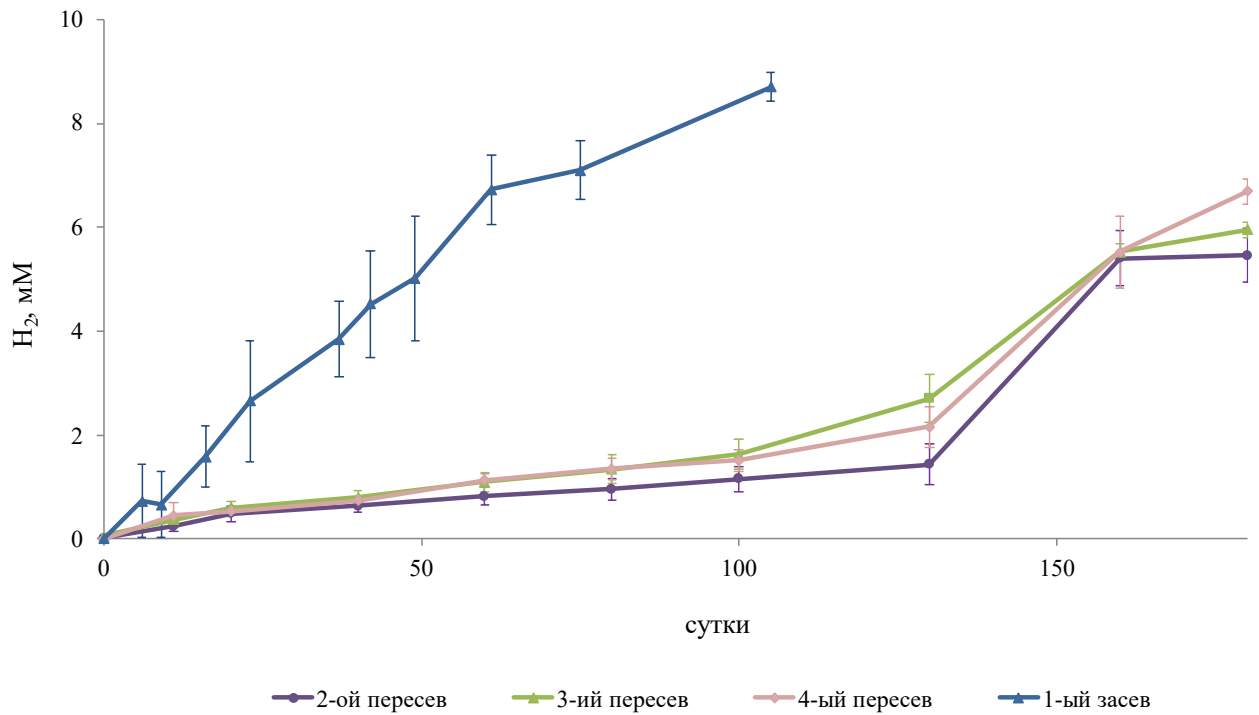


Рисунок 41. Образование H_2 в четырех последовательных пересевах *G. ferrihydriticus* в среде, содержащую стальную проволоку.

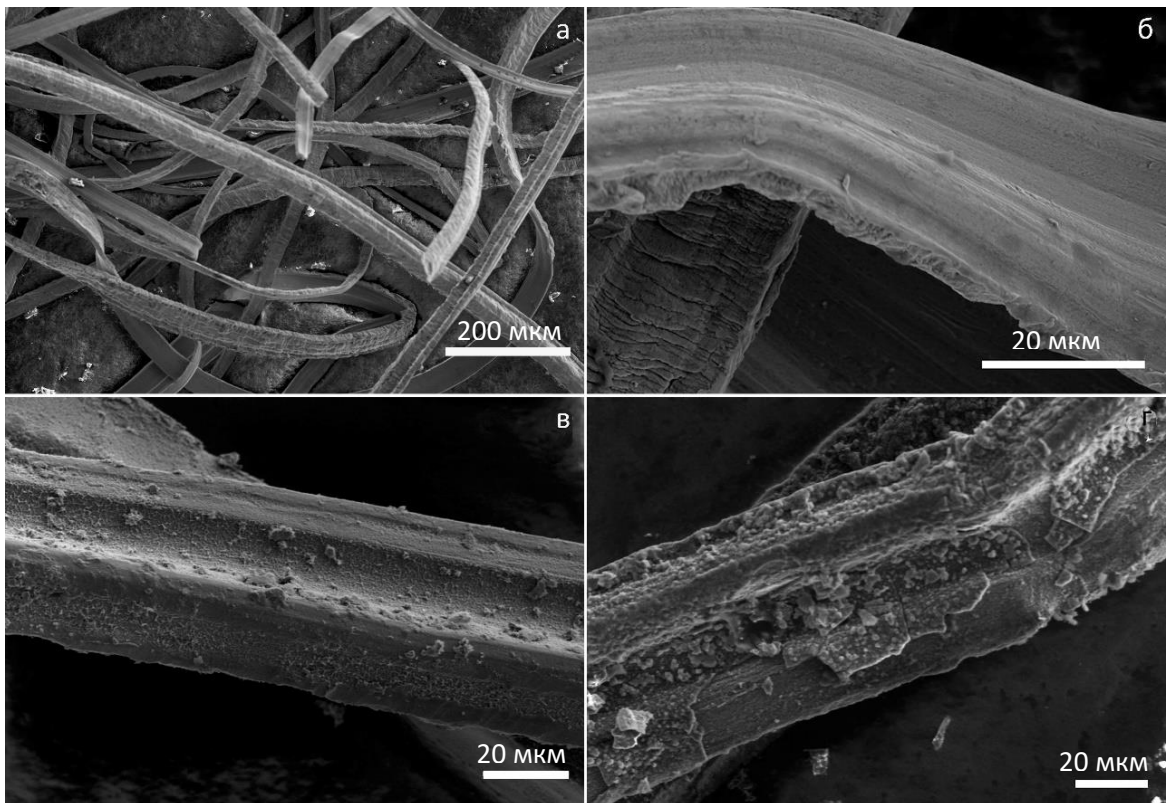


Рисунок 42. Микрофотографии стальной проволоки, выполненные методом СЭМ: (а, б) различные увеличения стальной проволоки до инкубации; (в) стальная проволока в стерильном контроле после 180 дней инкубации; (г) стальная проволока после 180 дней инкубации с *G. ferrihydriticus*.

превышало 4×10^6 клеток/мл. Сканирующая электронная микроскопия выявила изменения в структуре стальной поверхности, идентичные тем, что наблюдались в первом посеве - поверхность проволоки была интенсивно корродирована и покрыта «шубой» гексагональных таблитчатых кристаллов (Рис.42г, 43а-г), характерных для фужерита (Legrand et al., 2004). Минеральная фаза, образовавшаяся на дне флаконов, была представлена смесью глобул нанометрового размера, характерных для сидерита осадочного или биогенного происхождения (Рис.43д, е), и гексагональных кристаллов фужерита.

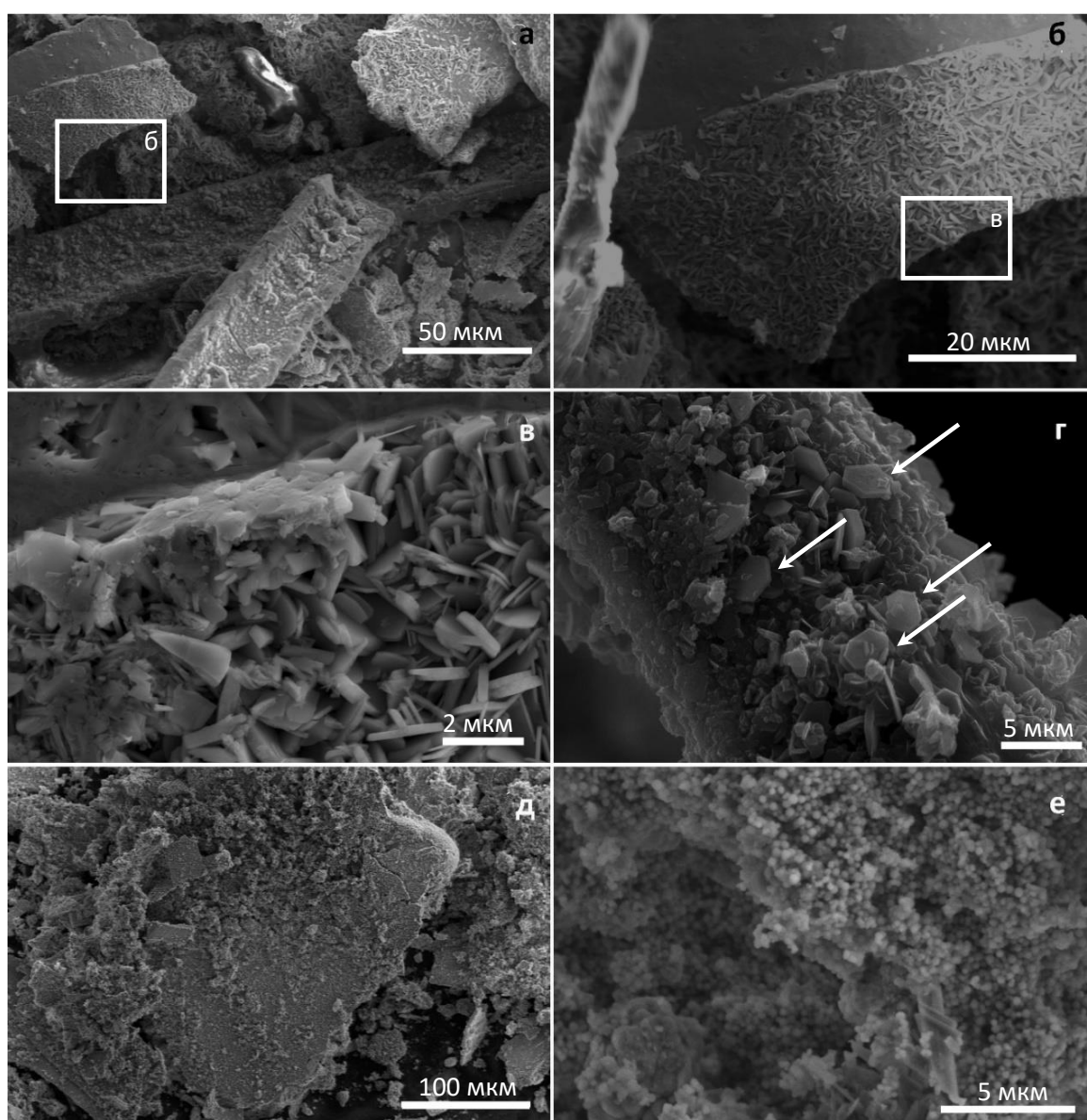


Рисунок 43. Микрофотографии стальной проволоки, выполненные методом СЭМ, после 180-дневной инкубации с *G. ferrihydriticus*: (а-в) различные увеличения стальной проволоки и осадка, содержащего табличные гексагональные кристаллы фужерита (стрелки); (г) кристаллы фужерита, сформированные на поверхности стальной проволоки; (д, е) микрофотографии осадка, сформированного во время роста *G. ferrihydriticus*, содержащего сферические кристаллы сидерита.

Анализ газовой фазы стерильных контролей показал, что в течение всего времени инкубации концентрация H_2 в газовой фазе колебалась в пределах 0.02 - 0.4 мМ. В анаэробном и аэробном стерильных контролях существенных изменений цвета и структуры стали не наблюдалось (Рис.40а-б), что подтверждалось и сканирующей электронной микроскопией (Рис.42в).

Результаты проведенных экспериментов выявили способность *G. ferrihydriticus* осуществлять биокоррозию стальной проволоки. Трансформация стали, сопровождающаяся активным выделением H_2 , приводила к накоплению продуктов окисления Fe^0 – карбонатов, содержащих атомы как закисного, так и окисного железа. Скорость и интенсивность биогенного процесса значительно превышала наблюдаемые аналогичные процессы в стерильных контролях. Учитывая выявленную нами ранее способность *G. ferrihydriticus* как восстанавливать, так и окислять железо, его метаболическая активность в данном случае могла быть обусловлена двумя разными процессами (Рис.44) - либо гидрогенотрофным восстановлением электрохимически образованного $Fe(III)$ (сценарий 1), либо прямым метаболическим окислением Fe^0 с протонами, выступающими в качестве вероятных акцепторов электронов (сценарий 2).

Сценарий I. Мёссбауэровский анализ стальной проволоки после 180-дневной инкубации в стерильной среде показал, что пассивирующая пленка, образующаяся на поверхности стали, состоит исключительно из фужерита, содержащего небольшое количество окисного железа, которое могло быть использовано *G. ferrihydriticus* в качестве акцепторов электронов. Катодная реакция, приводящая к образованию H_2 при электрохимическом разложении воды, могла обеспечить бактерию донором электронов. В этом случае сидерит, образование которого наблюдалось в экспериментах, являлся продуктом восстановления фужерита *G. ferrihydriticus* (Рис.44а). При этом *G. ferrihydriticus* одновременно реализует два пути биокоррозии - катодную деполяризацию за счет потребления H_2 и разрушение пассивирующей пленки за счет восстановления фужерита до сидерита. Однако в этом случае необъяснимым является постоянное увеличение концентрации H_2 в газовой фазе. Образовавшаяся в процессе эксперимента на поверхности проволоки мощная «шуба» фужерита, препятствует процессу деполяризации стали и электрохимическому разложению воды, что должно было бы отразиться на изменении концентрации водорода в газовой фазе, которого либо вообще не должно было детектироваться в газовой фазе из-за перехвата клетками *G. ferrihydriticus*, либо, достигнув определенного уровня, после которого невозможна была электрохимическая коррозия из-за образовавшегося на поверхности стали

фужерита, концентрация водорода должна была бы снижаться за счет его потребления *G. ferrihydriticus*.

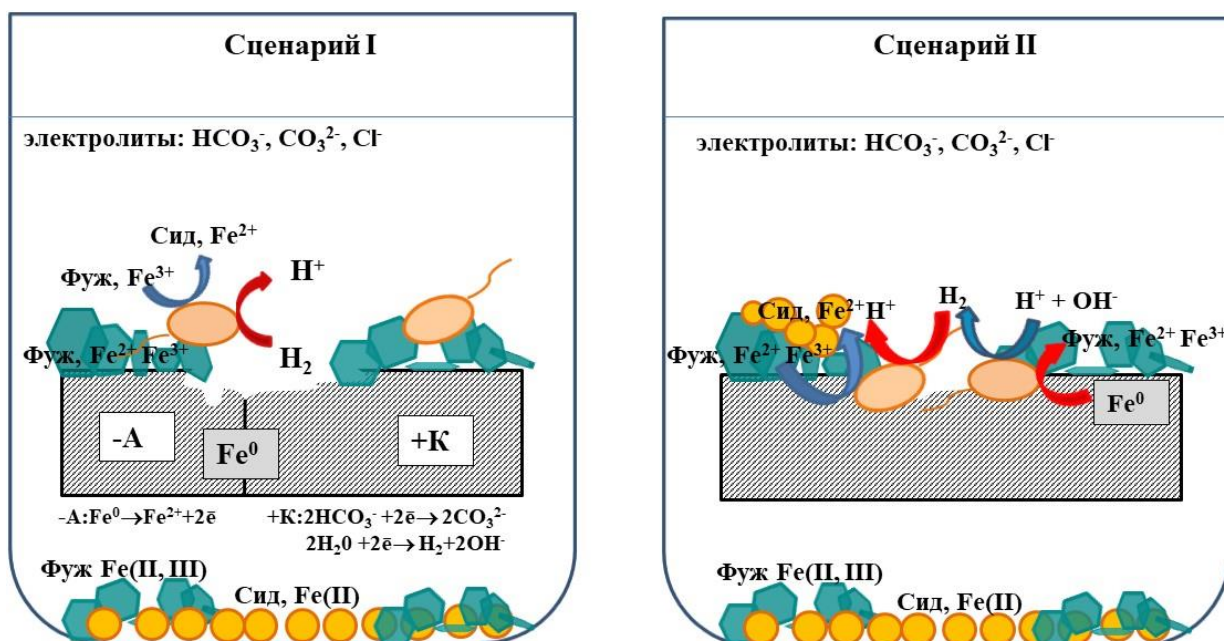


Рисунок 44. Схема предполагаемых коррозионных процессов, активируемых *G. ferrihydriticus*. Сценарий I - не прямой процесс, основанный на электрохимической коррозии. Сценарий II - процесс, вызванный прямым окислением металлического железа *G. ferrihydriticus* с последующим возможным литотрофным восстановлением фужерита в сидерит. Сокращения: Сид - сидерит; Фуж - фужерит; -А - анод; +К - катод.

Сценарий II, предполагает, что *G. ferrihydriticus* непосредственно использовал Fe^0 в качестве донора электронов, производя два окисленных продукта - фужерит и сидерит (Рис.44б). Наличие широкого набора мультигемовых цитохромов, обеспечивающих перенос электронов различными путями, позволяет ему окислять соединения железа в широком окне редокс-потенциала, включая разность потенциалов пары $\text{Fe}^0/\text{Fe}^{2+}$. Если этот процесс действительно приводит к коррозии в наших экспериментах, возникает вопрос об эффективном акцепторе электронов для микробного окисления железа. Предыдущие эксперименты позволили предполагать способность *G. ferrihydriticus* восстанавливать карбонат с образованием ацетата в качестве метаболического продукта, однако отсутствие даже следов ацетата в течение всего времени инкубации указывало на то, что в данном эксперименте карбонат вряд ли был акцептором электронов для *G. ferrihydriticus*. Альтернативным акцептором электронов в данном случае могут быть протоны воды.

Анализ генома *G. ferrihydriticus* показал, что организм обладает двумя генными кластерами, кодирующими [NiFe]-гидрогеназы группы 3, способными как окислять водород, так и образовывать его с использованием НАД(Ф)Н в качестве кофактора (например, донора электронов при образовании водорода из протонов). Примером таких ферментов может служить гидрогеназа из *Ralstonia eutropha* H16 (Burgdorf et al., 2005). Генные кластеры предполагаемых водородобразующих гидрогеназ *G. ferrihydriticus* кодируют субъединицы, взаимодействующие с НАД(Ф), железосерные субъединицы, каталитические субъединицы с NiFe-центром, а также специфические протеазы, участвующие в созревании (пост-трансляционной модификации) гидрогеназ. Интересно, что большая каталитическая субъединица ещё одной [NiFe]-гидрогеназы *G. ferrihydriticus*, гомологичной hydrogenase-2 из *E. coli* (Sargent, 2016) и предположительно окисляющей водород, имеет также гомологию с гидрогеназой *Desulfovibrio vulgaris*, штамма Miyazaki F, которая может использовать цитохром *c3* в качестве донора или акцептора электронов, в реакциях восстановления протона, или окисления водорода (Higuchi et al., 1997). Можно предположить, то такая гидрогеназа у *G. ferrihydriticus* является частью цепи переноса электронов от Fe⁰ через цитохромы на протон при использовании его в качестве акцептора электронов при анаэробном окислении сидерита. В этом случае понятно активное образование водорода, наблюдаемое в опытах.

Вероятность реализации сценария 2 подтверждают и последние исследования с “*G. halelectricus*”, опубликованные в пре-принтной статье (Yadav et al., 2023), который показал способность этого вида *Geoalkalibacter* напрямую использовать Fe⁰ в качестве донора электронов с фумаратом в качестве акцептора.

Присутствие организмов, обеспечивающих микробно-индуцированную биокоррозию в щелочной среде, может приводить к ускоренному разрушению и выходу из строя оборудования, работающего в таких условиях. Например, контейнеры из нержавеющей стали для ядерных отходов в бетонных бункерах могут подвергаться воздействию микробно-индуцированной биокоррозии, поскольку воды, просачивающиеся через бетон, часто характеризуются высокими значениями pH (King, 2009). Кроме того, бикарбонат и карбонат ионы считаются одними из наиболее важных и доступных электроактивных компонентов, способствующих коррозионным реакциям в нефте- и газопроводах (Eliyan and Alfantazi, 2014). Эксперименты с *G. ferrihydriticus* наглядно продемонстрировали способность алкалофильных анаэробов осуществлять этот процесс, что позволяет в дальнейшем оценить возможные риски, связанные с их жизнедеятельностью и выработать соответствующие меры борьбы с микробно-индуцированной биокоррозией в анаэробных щелочных средах.

ГЛАВА 7. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗВИТИЯ АНАЭРОБНЫХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ЗА СЧЕТ ТРАНСФОРМАЦИИ МИНЕРАЛОВ ЖЕЛЕЗА В АВТОТРОФНЫХ УСЛОВИЯХ

Проведенные нами экспериментальные исследования трансформаций минералов железа с чистыми и бинарными культурами анаэробных бактерий, выделенных из содовых озер, показали их способность использовать железо в качестве акцептора или донора электронов. Однако, для оценки значимости полученных результатов как для современных, так и для экосистем ранних этапов развития биосферы Земли, связанных с периодом преобладания биогеохимического цикла железа, важным было оценить возможность существования анаэробных микробных сообществ, связанных сложными трофическими взаимодействиями, за счет катаболических реакций с участием минералов железа в автотрофных экстремальных условиях (по pH или температуре).

7.1. Фототрофное сообщество, алкалофильных анаэробных бактерий из осадков озера Хадын

7.1.1. Получение устойчивой накопительной культур

Нами были проведен лабораторный эксперимент с накопительной культурой, полученной из донных отложений низкоминерализованного содового озера Хадын (Тыва, Россия). В качестве источника железа был использован синтезированный магнетит, в котором железо присутствует как в двух-, так и в трехвалентном состоянии, а также сидерит и искусственная смесь минералов, соответствующая усредненному составу континентальной коры (раздел 2.1). Источником углерода служил только карбонат-бикарбонатный буфер. Дрожжевой экстракт в среде отсутствовал, но был добавлен раствор витаминов (раздел 2.2). Таким образом, были созданы оптимальные условия для развития автотрофного сообщества микроорганизмов, специализированных на преобразовании минералов железа. Накопительная культура инкубировалась на свету при температуре 30 °С в течение месяца. В результате было зафиксировано развитие пурпурных бактерий образующих пленку характерной окраски на поверхности твердой фазы. После пяти последовательных пересевов, осуществляемых раз в месяц, была получена устойчивая накопительная культура, содержащая овальные клетки характерного для пурпурных бактерий морфотипа, а также палочек разных размеров. Таксономический состав культуры был определен методом высокопроизводительного секвенирования участков генов 16S рРНК (Рис.45).

Проведенный анализ таксономического разнообразия показал, что исходно филогенетически разнообразное микробное сообщество (Рис.45 (первая колонка)) в результате пересевов на селективной среде редуцировалось до, фактически, четырехкомпонентной системы, состоящей из представителей родов *Ectothiorodospira*, *Natronincola*, *Geoalkalibacter* и неидентифицированной бактерии (вторая и третья колонки). При этом сообщество было устойчивым, автономным, основанном на хемолитоавтотрофии, очевидно, связанной с процессами окисления/восстановления железа, так как для представителей родов *Natronincola* и *Geoalkalibacter* нами была показана способность использовать железо в катаболических реакциях (глава 3). Визуальное развитие пурпурных бактерий, характеризующееся появлением розовой вуали на поверхности минералов, наблюдалось не ранее, чем через 2-3 недели после засева. В зрелой культуре они доминировали, составляя 80-95% всех микроорганизмов. Анализ возможных продуктов жизнедеятельности сообщества выявил полное отсутствие идентифицируемых метаболитов, что могло быть связано с их немедленным вовлечением в качестве субстратов органотрофными бактериями с последующей полной минерализацией органического углерода до карбоната.

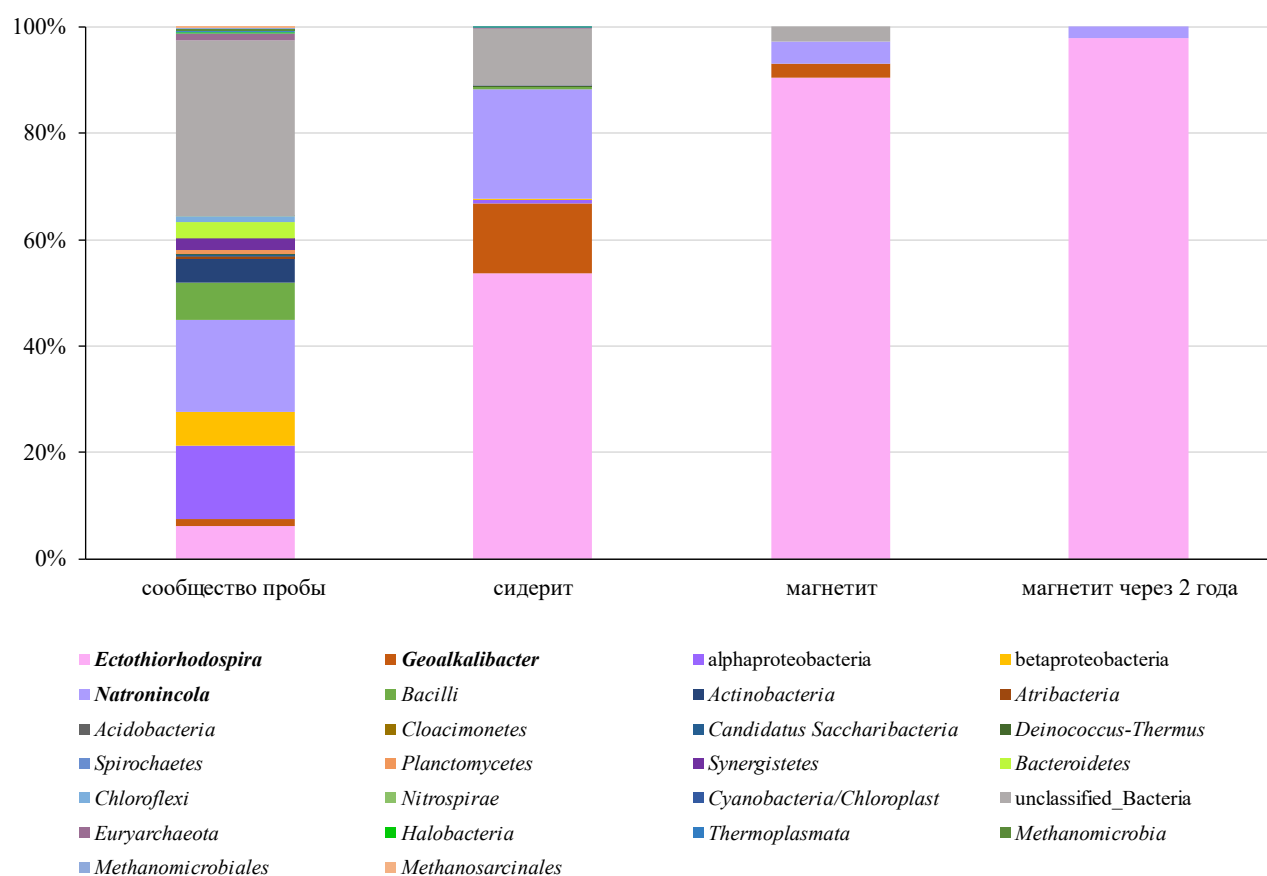


Рисунок 45. Изменение таксономического состава фототрофного сообщества при длительном культивировании с минералами

Для доказательства присутствия железоредукторов в накопительной культуре был сделан засев на среды с синтезированным ферригидритом и молекулярным водородом, пептоном, пируватом, ацетатом или этанолом в качестве возможных доноров электронов, инкубацией в темноте и затем определением таксономического разнообразия полученных сообществ. Проведенный анализ показал, что в этом случае ожидаемо существенно уменьшается доля аноксигенных пурпурных бактерий рода *Ectothiorodospira*, растет доля представителей рода *Natronincola* и, в целом, увеличивается микробное разнообразие, по сравнению с культурами, выросшими с минералами железа без добавления органики (Рис.46).

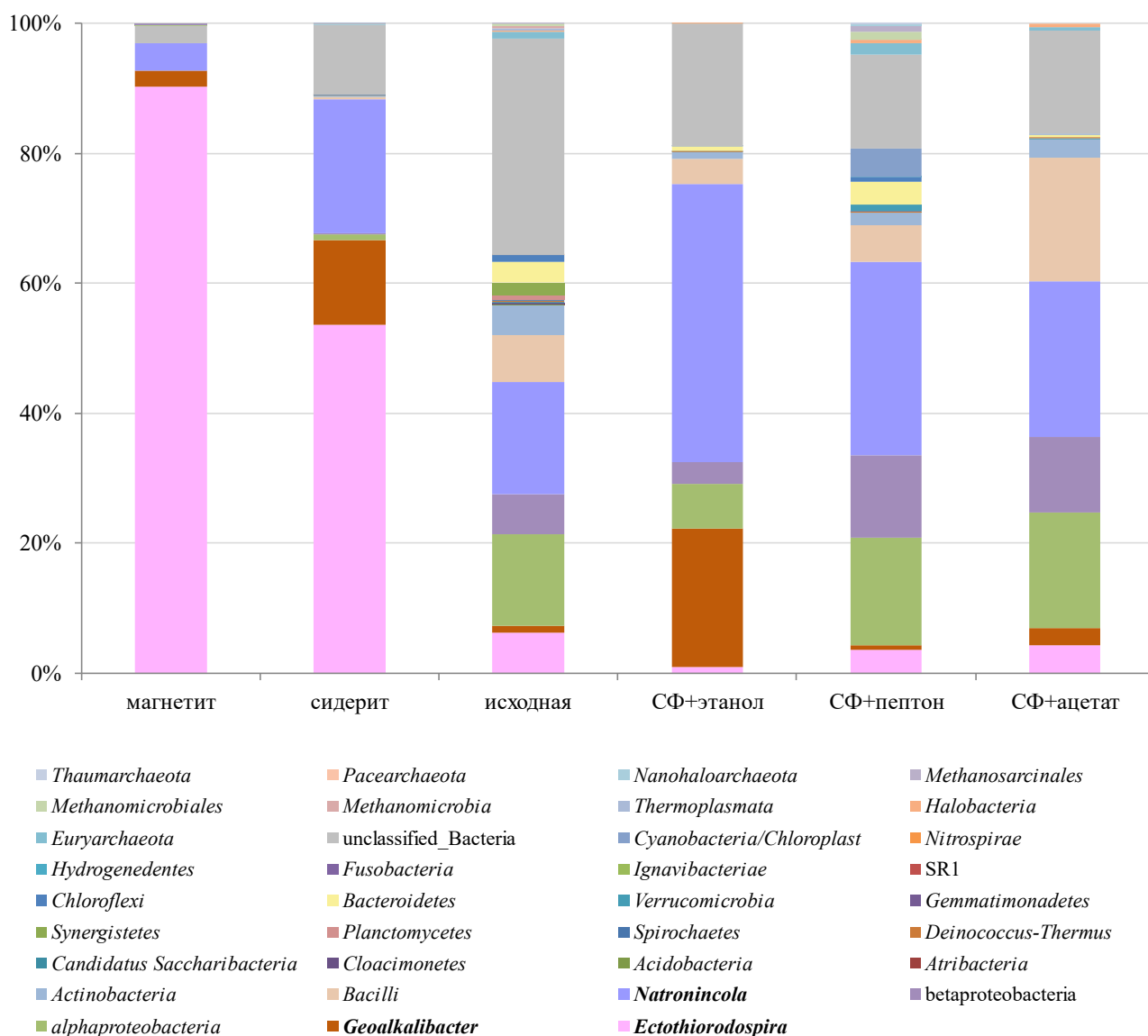


Рисунок 46. Изменение таксономического состава микробного сообщества донных осадков озера Хадын в присутствии неорганических (1, 2 колонки) и органических (4–6 колонки) доноров электронов.

Проведенные Мёссбауэровский и рентгеноспектральный анализы минеральных фаз в стерильных контролях и опытах показал, что в процессе развития микробного сообщества происходит перераспределение атомов двух- и трехвалентного железа, с увеличением доли трехвалентного железа, т.е. наблюдается окисление двухвалентного железа, входящего в состав магнетита и сидерита. Рентгеноспектральный анализ смеси минералов, имитирующей усредненный состав континентальной коры, показал существенное уменьшение доли биотита в опытном образце по сравнению с контрольным (Рис.47).

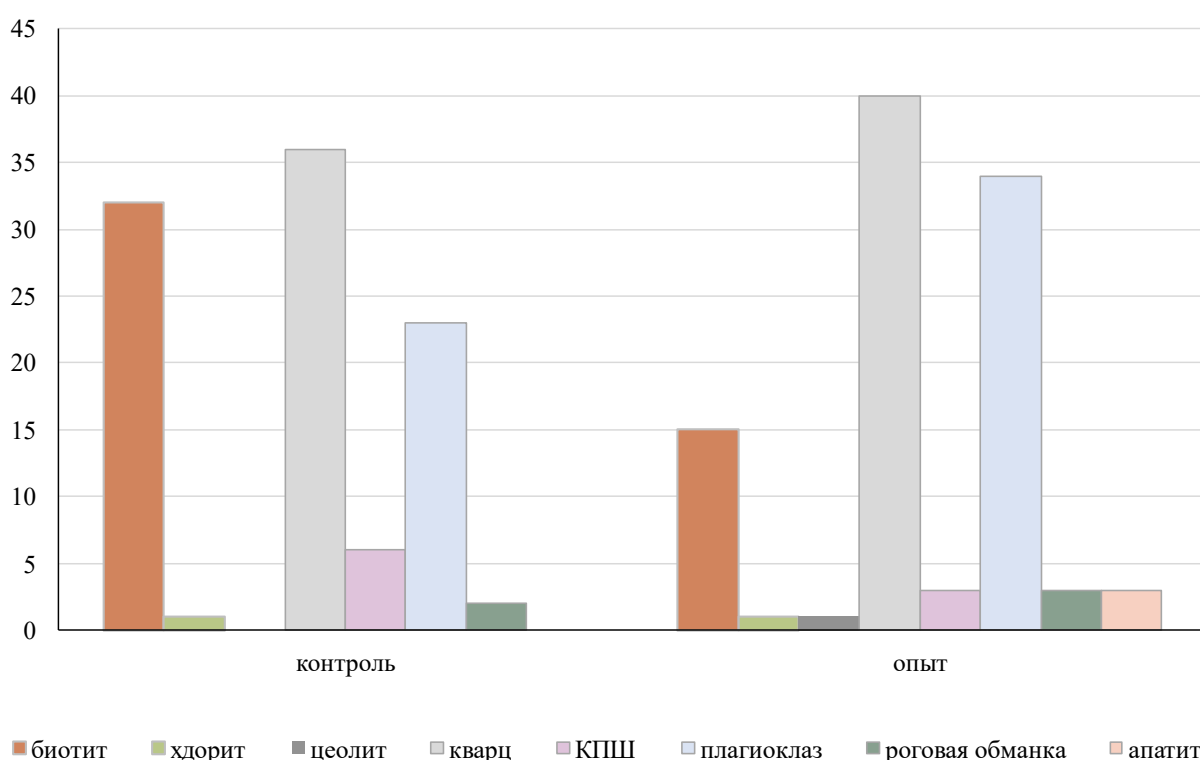


Рисунок 47. Изменения в составе «континентальной коры» под воздействием анаэробного фототрофного сообщества из озера Хадын, по данным рентгеноспектрального анализа. Сокращения: КПШ – калиевые полевые шпаты

Таким образом, удалось показать возможность развития анаэробного, алкалофильного фототрофного сообщества за счет анаэробного окисления оксидов, карбонатов или силикатов железа, с преобладанием в его составе аноксигенных пурпурных бактерий рода *Ectothiorodospira*.

7.1.2. Выделение микроорганизмов, входящих в состав накопительной культуры анаэробного фототрофного железоокисляющего сообщества

В результате дальнейших пересевов, проводимых как на сидерите, так и на магнетите на свету в течение двух лет, исходно разнообразное микробное сообщество озера Хадын

преобразовалось в бинарную культуру, состоящую из анаэробных фототрофов рода *Ectothiorodospira* и представителей рода *Natronincola* (Рис.48). При этом по данным Мёссбауэровского анализа в случае роста с магнетитом наблюдалось образование наночастиц, представляющих смесь магнетита и маггемита, а в случае сидерита образование магнетита (2-5%), в качестве новообразованной минеральной фазы, таким образом, происходило окисление исходных минеральных фаз. Измерения продуктов метаболизма, образующихся в процессе роста этой культуры, показали присутствие в качестве единственного продукта следовых количеств ацетата (0.1 - 0.4 мМ). При засеве этой бинарной культуры на среду синтезированным ферригидритом не наблюдалось его восстановления и рост бактерий прекращался, таким образом, энергдодающей реакцией в данном случае являлось именно анаэробное окисление железа.

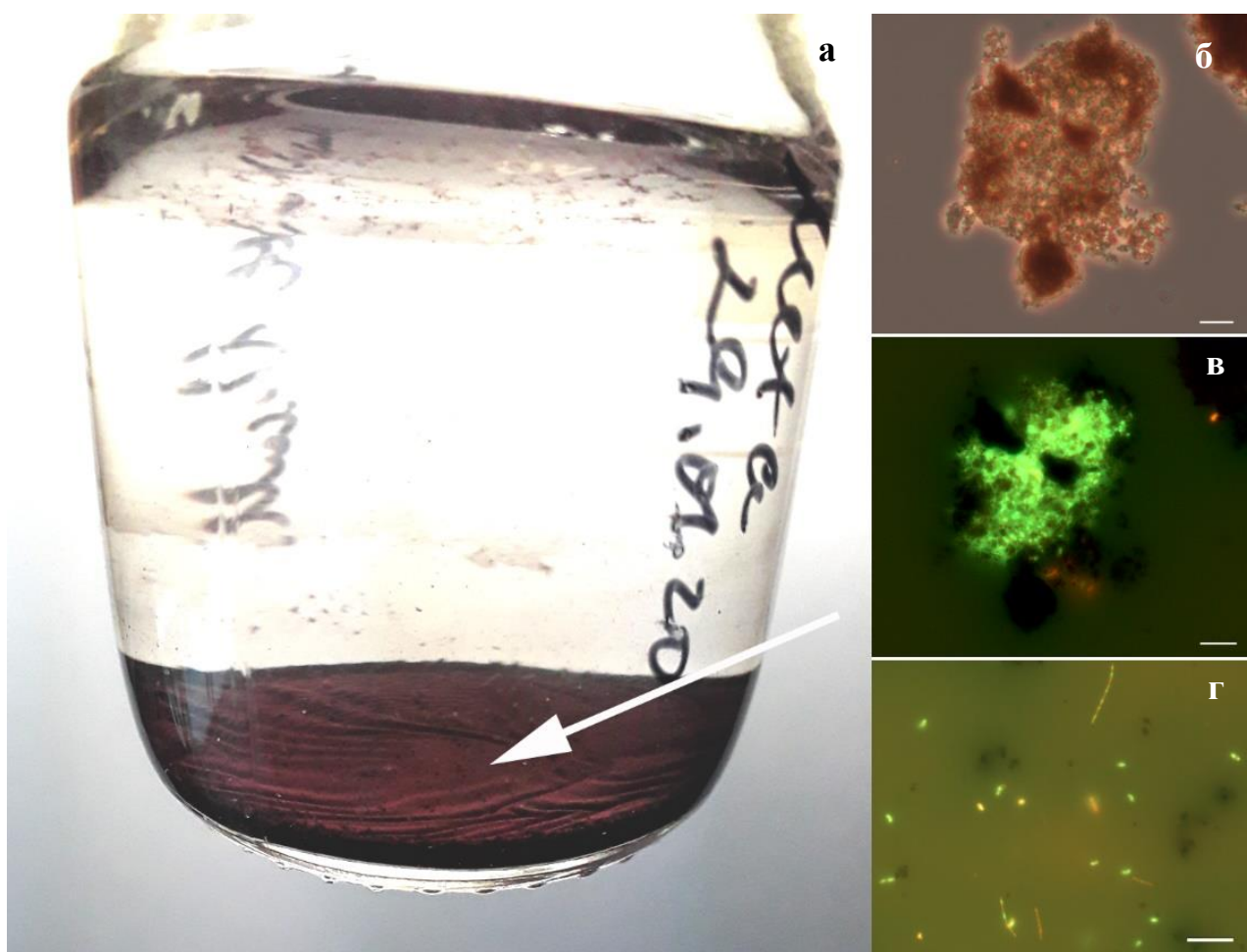
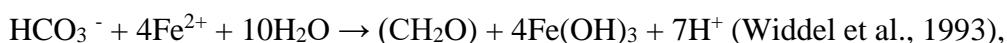
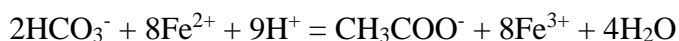


Рисунок 48. Образование пленки *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* на поверхности магнетита (а). Микрофотографии клеток фототрофа, колонизирующего магнетит в фазовом контрасте (б), флуоресцентной микроскопии (в) и клеток *Natronincola* (г) (масштабная линейка 10 мкм).

Возможностей для осуществления такого процесса было две – либо фотозависимое окисление железа аноксигенными пурпурными бактериями по реакции:



либо показанная нами ранее на примере чистых и бинарных культур карбонатзависимое окисление железа по реакции:



Для выяснения этого вопроса из полученного двухкомпонентного сообщества мы выделили оба его члена в чистые культуры, провели фенотипическое описание функциональных возможностей, связанных с интересующими нас процессами трансформации минералов железа, и для каждой бактерии получили геном.

По данным анализа 16S рРНК, выделенная из генома аноксигенная фототрофная бактерия, обозначенная нами как штамм Z-2002PH, имела высокий (99%) уровень сходства с видом *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*, являясь, таким образом, штаммом этого вида. Известно, что эта бактерия обладает широкими метаболическими возможностями, начиная от аноксигенного фотосинтеза с использованием сульфида в качестве донора электронов, до анаэробного брожения в темноте. Показана ее способность восстанавливать тиосульфат, использовать водород и разнообразные органические кислоты и спирты на свету в качестве доноров электронов (Кондратьева, 1972). Проведенные нами исследования показали, что *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* может расти в присутствии низких концентраций ацетата (0.1 мМ), с урожаем клеток 1×10^6 кл/мл. Значительных изменений в твердых фазах в опытах с чистой культурой *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* на среде с магнетитом и сидеритом методом Мёссбауэровской спектроскопии выявить не удалось, хотя урожай клеток в этом случае достигал 1×10^7 кл/мл. В то же время в темноте в автотрофных условиях рост культуры в присутствии минералов железа прекращался.

Проведенный анализ генома выделенного штамма Z-2002PH показал наличие у него кластеров генов, гомологичных оперону *pio*, обуславливающего фототрофное окисление Fe(II) у *Rhodopseudomonas palustris*. Этот оперон содержит три гена, из которых *pioA* кодирует цитохром *c*-типа, который экспрессируется в случае культивирования в присутствии закисного железа и имеет общую гомологию с геном MtrA - декагемовым цитохромом *c*-типа, детектированным у *Shewanella oneidensis* штамм MR-1. Второй ген, *pioB*, кодирует наружный мембранный белок и является гомологом MtrB из *S. oneidensis* MR-1. Третий ген, *pioC*, кодирует предполагаемый высокопотенциальный железо-серный белок (HiPIP) и похож на

предполагаемую Fe(II) оксидоредуктазу (Iro) из *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Показано, что удаление оперона *pio* приводит к потере не только активности окисления Fe(II), но и роста на Fe(II) (Jiao and Newman, 2007).

Чистая культура анаэробной бактерии - спутника фототрофа, обозначенная как штамм Z-2001PH, по данным анализа 16S рРНК, выделенной из генома, а также геномного анализа, основанного на сходстве 120 консервативных генов, являлась новым родом в семействе *Natronincolaceae*. Ближайшим родственником штамма Z-2001PH в этом семействе была ацетогенная бактерия *Natronincola histidinovorans* (уровень сходства по данным анализа 16S рРНК 92.37%), выделенная из содового озера Магади (Кения). Эта бактерия обладает высокоспецифичным метаболизмом и растет за счет использования только двух аминокислот – гистидина и глутамата, в качестве продуктов метаболизма образуя ацетат и аммоний (Zhilina et al., 1998). Анализ метаболических возможностей выделенной нами бактерии показал, что штамм Z-2001PH способен к росту на пептидах (дрожжевой, мясной экстракты, пептон), этаноле, а также литотрофному росту на водороде. При этом единственным восстановленным углеродсодержащим продуктом, образующимся в процессе роста бактерии был ацетат. Штамм Z-2001PH оказался неспособным к железоредукции с перечисленными донорами и неспособным к росту в автотрофных условиях с магнетитом или сидеритом в качестве доноров электронов. Анализ генома штамма Z-2001PH выявил полное отсутствие детерминант окисления или восстановления соединений железа.

Таким образом, на основании проведенных исследований нам удалось выявить неизвестную ранее способность фототрофной бактерии *E. shaposhnikovii* к анаэробному фотозависимому окислению железа, которая значительно усиливалась в бинарной культуре с органотрофной ацетогенной бактерией семейства *Natronincolaceae*. Интересно, что *N. histidinovorans* – ближайшая родственница выделенного нами штамма, также была выделена, как спутница *Ectothiorhodospira* и, очевидно, развивалась за счет разложения мортмассы этой фототрофной бактерии. Важным является тот факт, что в результате длительных последовательных пересевов в автотрофных условиях с магнетитом или сидеритом в качестве возможных доноров электронов первично разнообразное сообщество донных осадков озера Хадын редуцировалось до двухкомпонентной системы, состоящей из аноксигенного фототрофа и ацетогена, причем обе бактерии могли расти хемолитотрофно. Стимулирующий эффект присутствия ацетогена на рост фототрофа и степень окисления магнетита и сидерита, очевидно, были связаны с возможностью использования ацетата *E. shaposhnikovii* в качестве дополнительного донора электронов. Схема взаимодействия в образовавшейся бинарной культуре изображена на рисунке 49.

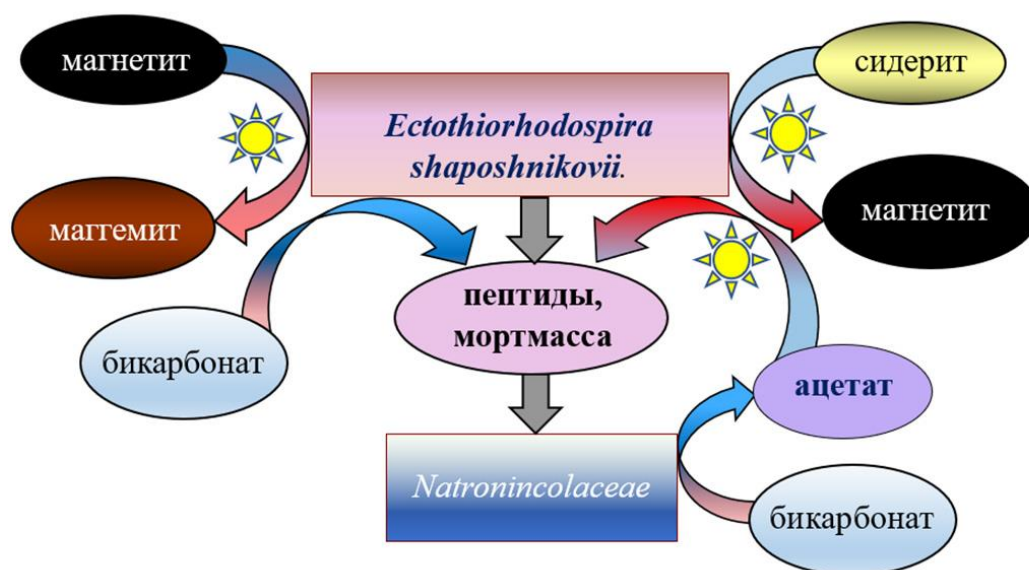


Рисунок 49. Схема, демонстрирующая взаимодействие алкалофильных бактерий в бинарной культуре, осуществляющей фотозависимое анаэробное окисление железа, входящего в состав магнетита и сидерита.

7.2. Микробное сообщество термофильных анаэробных бактерий, осуществляющих циклическую трансформацию сидерита

Проведенные нами комплексные экспериментальные исследования показали, что в щелочных анаэробных условиях при крайне низкой растворимости железа основную роль в катаболических реакциях с участием этого элемента играют его минералы. Выделение и описание новых литоавтотрофных алкалофильных бактерий, способных к трансформации минералов железа (глава 3) показало, что эти микроорганизмы тесно связаны, с одной стороны, с циклом серы за счет способности к сероредукции, с другой стороны, с процессами ацетогенеза поскольку во всех процессах, связанных с окислением железа, наблюдалось образование ацетата. Интересно, что согласно проведенной недавно геномной реконструкции метаболизма последнего универсального общего предка (LUCA) предполагается, что он был анаэробным, CO_2 , N_2 -фиксирующим, H_2 -потребляющим термофильным микроорганизмом, способным к литотрофному гомоацетогенезу (Weiss et al., 2016). С другой стороны, внеклеточный перенос электронов, включающий процессы анаэробного восстановления и окисления минералов железа, как полагают, был одним из первых дыхательных путей, появившихся на Земле (Lusk, 2019). Наши исследования показали возможность существования в периодической культуре алкалофильного сообщества, существующего за

счет фотозависимого окисления магнетита или сидерита, причем после длительных пересевов в культуре остались всего два вида бактерий, которые получали энергию за счет фотозависимого окисления железа и ацетогенеза.

Период накопления железисто-кремнистых формаций докембрия без сомнения следует считать временем наиболее активного функционирования анаэробного биогеохимического цикла железа и активизации микробных процессов с ним связанных. Условия образования этих формаций, прежде всего температура, состав и pH океанической воды, первичные пороодообразующие минералы, до сих пор являются предметом активных дискуссий. Очевидно, что во время массового накопления железистых кварцитов в анионный состав воды океана не входили сульфаты, а карбонатное равновесие, обусловленное растворенным бикарбонатом и парциальным давлением CO₂ играло ведущую роль в поддержании pH (Blättler et al., 2017). При этом оценки значений pH существенно разнятся у разных авторов, от 6.5 до 7.0 (Halevy and Vachan, 2017) до гипотезы содового океана с pH 9.5-10.0 (Kemp and Degens, 1985). Температура на поверхности Земли в Архее-Протерозое, по-видимому, колебалась от 0 до 40 °C (Catling and Zahnle, 2020), однако существенный вклад гидротермальных процессов в процесс образования железистых кварцитов типа Алгома не вызывает сомнений (Bekker et al., 2014; Klein, 2005; Krapež et al., 2003; Simonson, 2003). Большинство исследователей сходятся во мнении, что железо поступало из мантии в двухвалентной форме и многие считают, что сидерит был одним из первичных пороодообразующих минералов железисто-кремнистых формаций докембрия (Холодов и Бутузова, 2004; Klein, 2005; Krapež et al., 2003; Simonson, 2003; Jiang and Tosca, 2019). В связи с проведенными экспериментальными исследованиями и литературными данными, касающимися условий формирования железистых формаций докембрия и вклада биогенных процессов в эти процессы (Köhler et al., 2010; Bekker et al., 2014; Klein, 2005), было важно экспериментально проверить возможность существования анаэробного термофильного сообщества, развивающегося в интервале pH 6.5-7.0, в бессульфатной карбонатной среде, не содержащей органики, с закисным железом, входящим в состав сидерита, как единственным донором электронов.

7.2.1. Получение устойчивой накопительной термофильной культуры, осуществляющей анаэробное окисление сидерита в автотрофных условиях

Для эксперимента были использованы пробы воды и осадка, отобранные из термального источника Солнечный в кальдере Узон (54°29.5632N/159°59.3164E, 52°C, pH 6.1), в 2015 году (Рис.50а). Выбор этого объекта был обусловлен, во-первых, выраженными

охристыми отложениями оксидов железа, покрывающих дно воронки, активным выделением CO₂ из центрального отверстия, и, во-вторых, исключительно широким таксономическим разнообразием микробного сообщества, населяющим этот источник (Menzel et al., 2015) (Рис.50б). Температура и уровень pH в источнике остаются довольно стабильными на протяжении нескольких лет наблюдений; значение Eh отрицательное и составляет -34 мВ (против стандартного водородного электрода, SHE) на глубине 0.5 м и около нуля на поверхности воды, где на его показатели оказывают влияние атмосферные осадки. Образец был отобран со дна источника на глубине 10 см ниже поверхности осадка в стерильный анаэробный 50 мл флакон, после чего хранился в лаборатории в холодильнике.

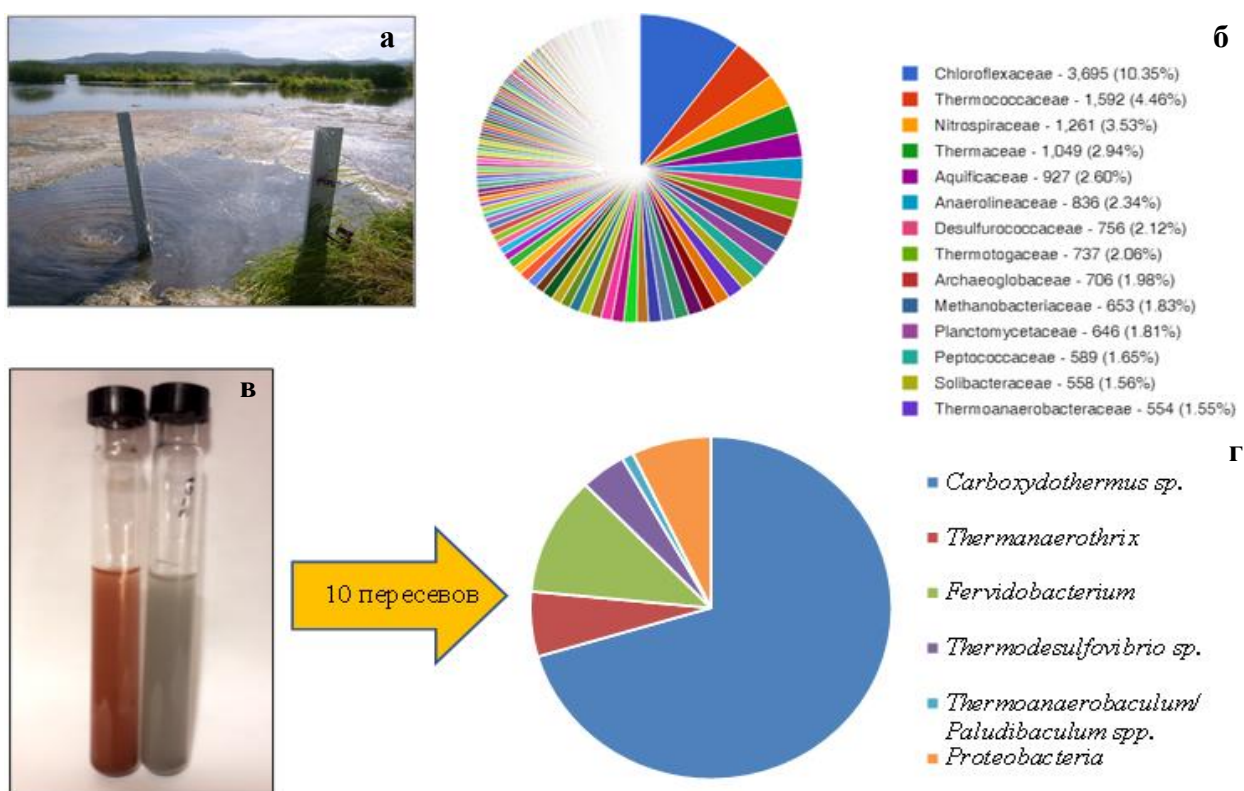


Рисунок 50. Термальный источник Солнечный (а) и филогенетическое разнообразие его сообщества (показаны только бактериальные таксоны) (б); изменение цвета гидротермального сидерита (левая пробирка) после роста накопительной культуры (правая пробирка) (в); таксономический состав накопительной культуры после 10 последовательных пересевов (г)

Накопительная культура была получена на анаэробной бикарбонатной среде с сидеритом (pH 6.8, T 60°C), и ее рост сопровождался ярко-выраженным изменением первоначального цвета осадка с коричневого на серый (Рис.50в). Стабильный сидерит-окисляющий анаэробный термофильный микробный консорциум (Рис.50г) был получен

путем десятикратного разведения первичной накопительной культуры и многократного (10 раз) последовательного пересева из последнего положительного разведения (10^{-6}) на бикарбонатную среду *Пф*, содержащую сидерит гидротермального происхождения (раздел 2.2.) (20 г/л) в качестве донора электронов и 20% CO_2 в газовой фазе в качестве акцептора электронов. После десяти дней инкубации численность микробной популяции достигала 5×10^6 клеток/мл, в культуре образовывалось до 0.5 мМ ацетата, а сидерит преобразовывался в серый осадок и тонкие минеральные пластинки зелено-коричневатого цвета (Рис.51). Новая минеральная фаза была идентифицирована с помощью Мёссбаэровской спектроскопии как фужерит (Табл.16, рис. 52). С помощью сканирующей электронной микроскопии было обнаружено, что тонкие сферические кристаллы фужерита образуются на поверхности частиц гидротермального сидерита (Рис.51 б-в). Минеральные пластины толщиной от 15 до 20 мкм, образующиеся в процессе роста термофильного сообщества (фото флакона на рисунке 51) состояли из таблитчатых кристаллов фужерита, расположенных во взаимно перпендикулярной ориентации (Рис.51г-е).

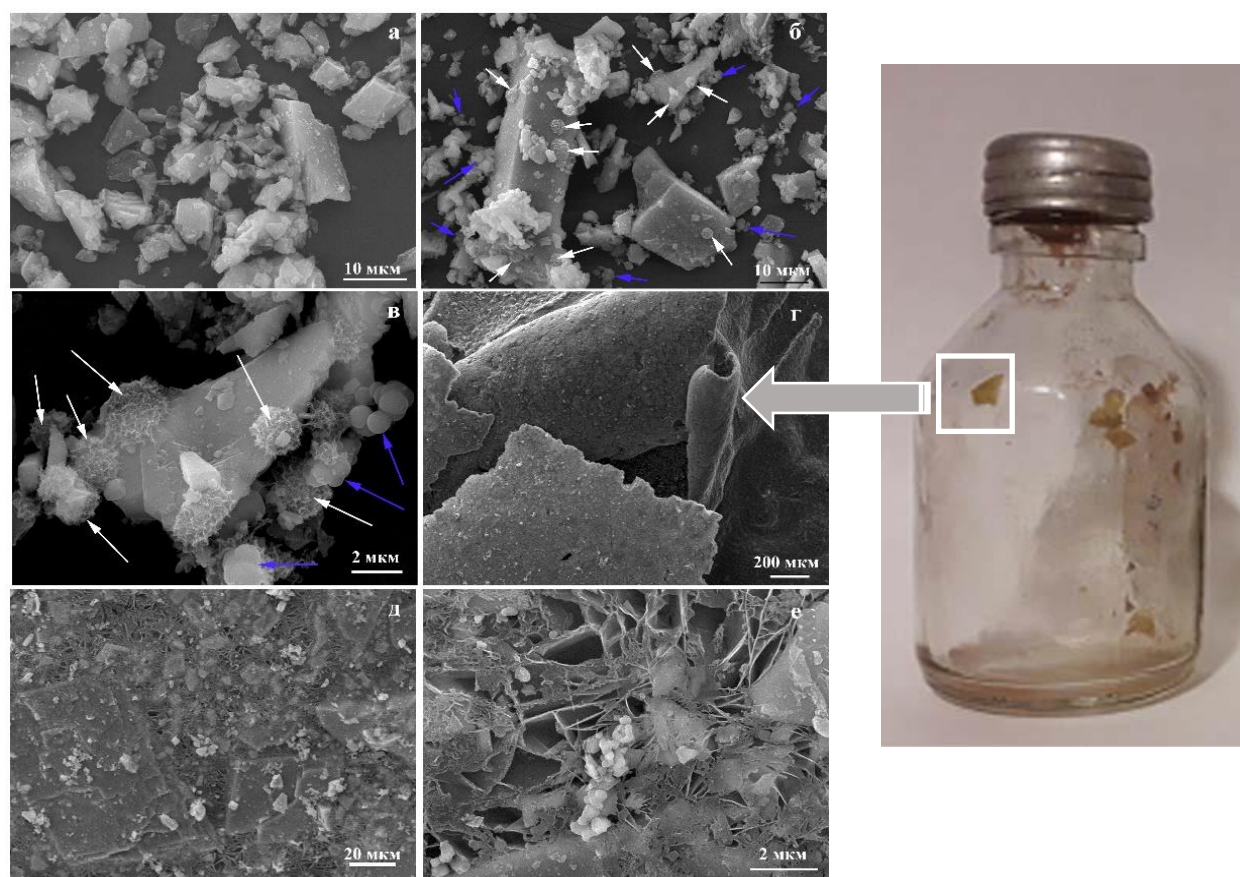


Рисунок 51. СЭМ-микрофотографии твердой фазы после 10 переносов накопительной культуры на среде с сидеритом: (а) сидерит в стерильном контроле; (б, в) твердая фаза в опыте: частицы сидерита с новообразованными кристаллами фужерита (белые стрелки) и сферолиты биогенного сидерита, сформированные отдельно (синие стрелки); (г) общий вид пластин фужерита; (д, е) таблитчатые кристаллы фужерита, расположенные во взаимно перпендикулярном направлении.

Таблица 16. Сверхтонкие параметры Мёссбауэровских парциальных спектров твердофазного образца из сидерит-окисляющего анаэробного термофильного микробного сообщества, полученного после 10 последовательных переносов накопительной культуры на среде с гидротермальным сидеритом. I - относительная интенсивность, δ - изомерный сдвиг, ε - квадрупольный сдвиг.

Фаза	I , %	δ , мм/с	ε , мм/с
гидротермальный сидерит (D_1)	89.6 ± 2.2	1.22 ± 0.01	0.88 ± 0.01
фужерит Fe^{2+} (D_2)	5.3 ± 1.1	1.22 ± 0.06	1.32 ± 0.08
фужерит Fe^{3+} (D_3)	5.1 ± 0.8	0.31 ± 0.08	0.22 ± 0.03

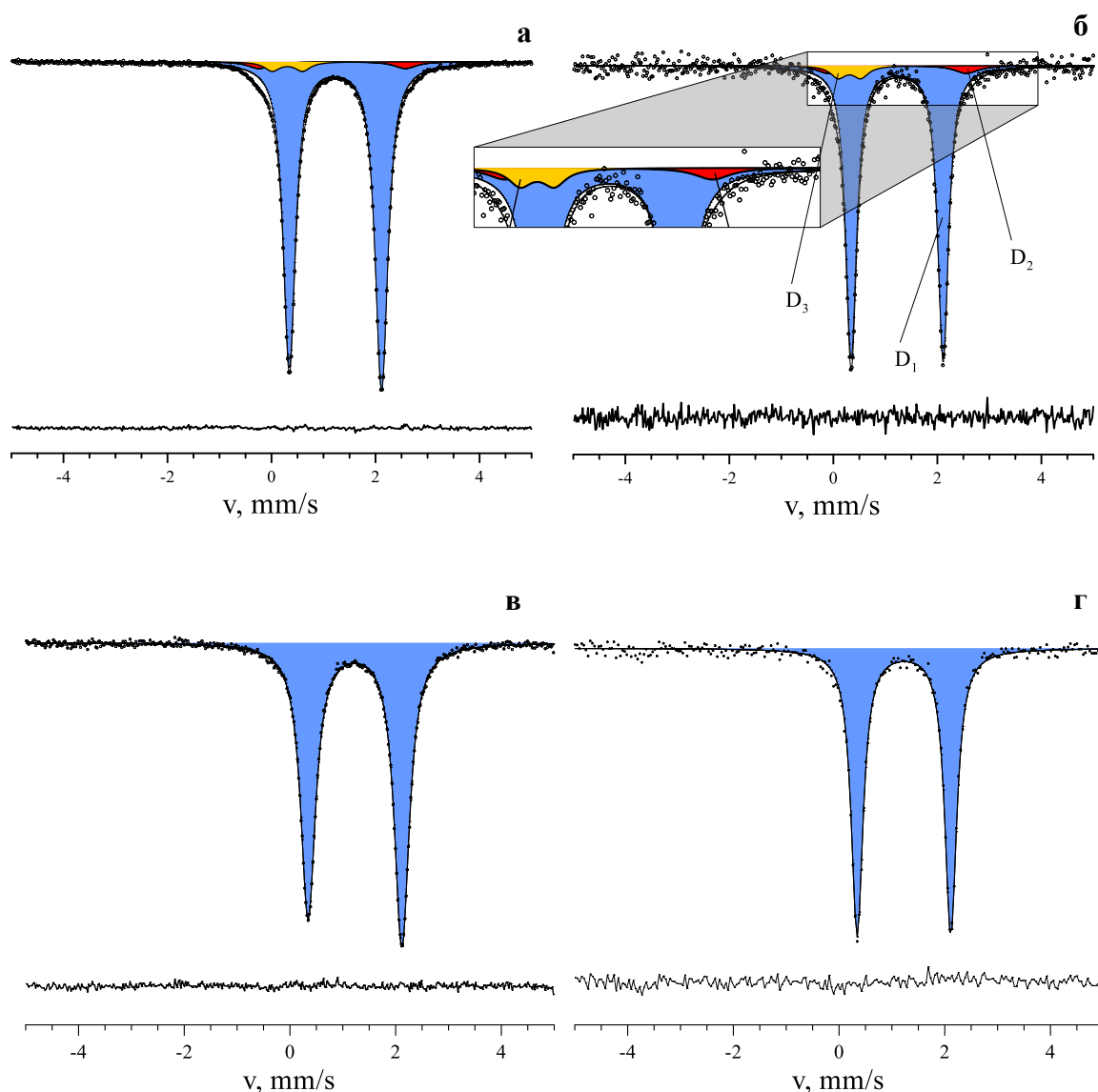


Рисунок 52. Мёссбауэровские спектры образца твердой фазы, полученного после 10 последовательных переносов накопительной культуры на среде с гидротермальным сидеритом. Опыт, измеренный при 25 °С (а); под "магическим углом" $\theta = 54.7^\circ$ (б); Стерильный контроль, измеренный при комнатной температуре (в); под "магическим углом" $\theta = 54.7^\circ$ (г). D_1 - ионы Fe^{2+} в структуре сидерита, D_2 - ионам Fe^{2+} , D_3 - ионам Fe^{3+} в структуре фужерита.

Анализ численности и разнообразия микроорганизмов в сидерит-окисляющем сообществе, проведенный методом высокопроизводительного секвенирования участков гена 16S рРНК, показал преобладание грамположительных бактерий рода *Carboxydotherrnus* (69% всего сообщества). Остальная часть сообщества была представлена родами *Fervidobacterium* (11%), *Thermanaerothrix* (6%), *Thermodesulfovibrio* (4%), *Thermoanaerobaculum* и *Paludibaculum* (всего 1%) (Рис.50г). Анализ литературы показал, что представители большинства родов, представленных в сформировавшемся сообществе связаны с циклом железа. Некоторые представители рода *Carboxydotherrnus* способны к ацетогенезу за счет пути Вуда-Люнгдала, а также могут осуществлять внеклеточный перенос электронов и способны к железоредукции (Slobodkin et al., 2006; Yoneda et al., 2006). Виды других родов, например, *Thermodesulfovibrio*, *Thermoanaerobaculum* и *Paludibaculum*, также способны восстанавливать железо (Sekiguchi et al., 2008; Losey et al., 2013; Kulichevskaya et al., 2014). Способность этих бактерий осуществлять анаэробное окисление Fe(II) никогда не проверялась, но выявленные ранее филогенетические связи между Fe(III)-восстанавливающим и Fe(II)-окисляющим путями внеклеточного переноса электронов (Feng et al., 2020; Shi et al., 2014, Yadav et al., 2023), а также наши исследования, продемонстрировавшие способности *G. ferrihydriticus* и *D. alkaliphilus* штамм Z-1002 восстанавливать и окислять минералы железа в анаэробных условиях (глава 6) допускают такую возможность.

7.2.2. Масштабирование эксперимента в анаэробном ферментере

Для изучения кинетики процесса биогеохимической трансформации сидерита полученной накопительной культурой был проведен эксперимент в ферментере. Для этого настольный ферментер, заполненный 3 л стерильной среды с добавлением 300 г сидерита, заседали 180 мл инокулята (6 об %). Ферментер работал в течение 56 дней в режиме медленного перемешивания с контролем температуры и рН, при котором дно реактора со слоем сидерита объемом около 300 мл находилось в стационарном состоянии, водный столб над твердой фазой периодически продувался газовой смесью N₂/CO₂ (80/20 об%) и перемешивался со скоростью 50 об/мин, а над толщей воды оставалось небольшое (0.6 л) газовое пространство, содержащее газовую смесь N₂/CO₂/O₂ (78/20/2 об%), с контролируемым оттоком газа для предотвращения избыточного давления. Таким образом, объемное соотношение между твердой, жидкой и газовой фазами в ферментере составляло примерно 1:9:2 (об/об). В процессе эксперимента через каждые 7 дней производился отбор проб для мониторинга микробного роста, образования ацетата и трансформации сидерита для чего перед каждым отбором проб запускали активное перемешивание (450 об/мин в течение 30

мин), чтобы обеспечить равномерное распределение компонентов культуры и твердой фазы по всему объему ферментера.

В отличие от исходной культуры, в течение эксперимента не наблюдалось изменения цвета сидерита. Мёссбауэровский спектроскопический анализ показал, что в процессе трансформации исходного гидротермального сидерита происходит линейное увеличение новой фазы, идентифицированной как новообразованный сидерит (Табл.16, рис. 51), спектральные характеристики которого отличаются от исходного. Этот результат был подтвержден методом рентгенофазового спектрального анализа, показавшего разницу в параметрах кристаллической решетке исходного ($a=4.684\pm 0.001\text{Å}$, $c=15.386\pm 0.001\text{Å}$) и новообразованного ($a=4.701\pm 0.001\text{Å}$, $c=15.407\pm 0.005\text{Å}$) сидерита. Помимо нового дублета, Мёссбауэровский анализ показал образование секстета, соответствующего магнетиту, количество которой оставалось практически неизменным на протяжении всего эксперимента (Рис.53, Табл. 17). Присутствие магнетита было подтверждено спектральными характеристиками электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) опытных и контрольных образцов минералов, определенными в конце инкубации. В спектрах опытных образцов наблюдался значительное увеличение сигнала от присутствия магнетита (ширина спектра составляла около 1300 Ое, а g-фактор был равен 2.3, что соответствует характеристикам наноразмерного магнетита (Gorin et al., 2009).

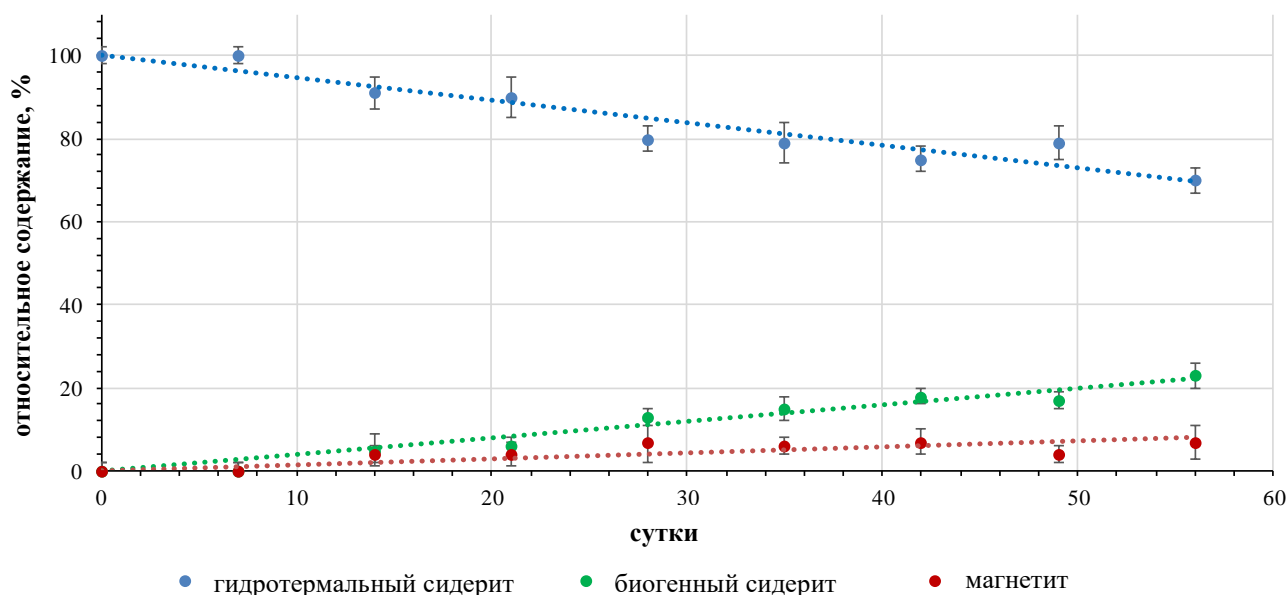


Рисунок 53. Изменение состава твердой минеральной фазы в ферментере под воздействием анаэробного термофильного сообщества течение инкубационного периода.

Таблица 17. Сверхтонкие параметры Мёссбауэровских спектров твердой фазы, отобранной из ферментера в конце инкубации. I - относительная интенсивность, δ - изомерный сдвиг, ε - квадрупольный сдвиг, H - сверхтонкое магнитное поле.

Фаза	I , %	δ , mm/s	ε , mm/s	H , kOe
гидротермальный сидерит (D ₁)	70.0±3.0	1.23±0.01	0.88±0.01	–
биогенный сидерит (D ₂)	23.0±3.0	1.19±0.01	0.92±0.01	–
магнетит (S)	7.0 ±4.0	0.36±0.03	-0.11±0.03	488±2

Проведенный в конце эксперимента с помощью сканирующей электронной микроскопии анализ минеральной фазы выявил образование большого количества сферолитов сидерита со средним размером около 2-5 мкм, типичной морфологии, зафиксированной нами ранее в экспериментах с бинарной культурой *G. ferrihydriticus* и *A. alkalilacustris* (глава 4) (Рис.54). Некоторые сферолиты формировались на поверхности частиц гидротермального сидерита (Рис.54в). Также наблюдались наночастицы минералов, инкрустирующих бактериальные клетки (Рис.54г). Глобулы состояли из слегка изогнутых плоских ромбоэдрических кристаллов размером в несколько нанометров (Рис.54д, е). Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (EDS) показала, что элементный состав новообразованных сферолитов идентичен элементному составу частиц гидротермального сидерита и, таким образом, подтверждает данные Мёссбауэровской спектроскопии и рентгенографии. Единственным существенным различием в элементном составе гидротермального сидерита и сферолитов было повышенное содержание фосфора в последних, что указывало на их биогенное происхождение (Рис.54б, д, е; Табл. 18).

Анализ таксономического состава сообщества показал существенное преобладание в ферментере бактерий рода *Thermanaerotherix*, начиная с 25-го дня инкубации и до конца эксперимента (Табл.19). Общая численность микробной популяции увеличилась с 3.0×10^5 до 1.0×10^7 клеток/мл к 7-му дню эксперимента и затем изменялась незначительно, как и концентрация ацетата (Табл.19).

Общее содержание органического углерода в минеральных фазах, проанализированное методом пиролиза Rock-Eval33 в конце инкубации было в двадцать раз выше в опытном образце по сравнению в контрольном (0.043 против 0.002 масс. %), что указывало на процесс активной ассимиляции углекислоты в процессе бактериального роста (Табл.18).

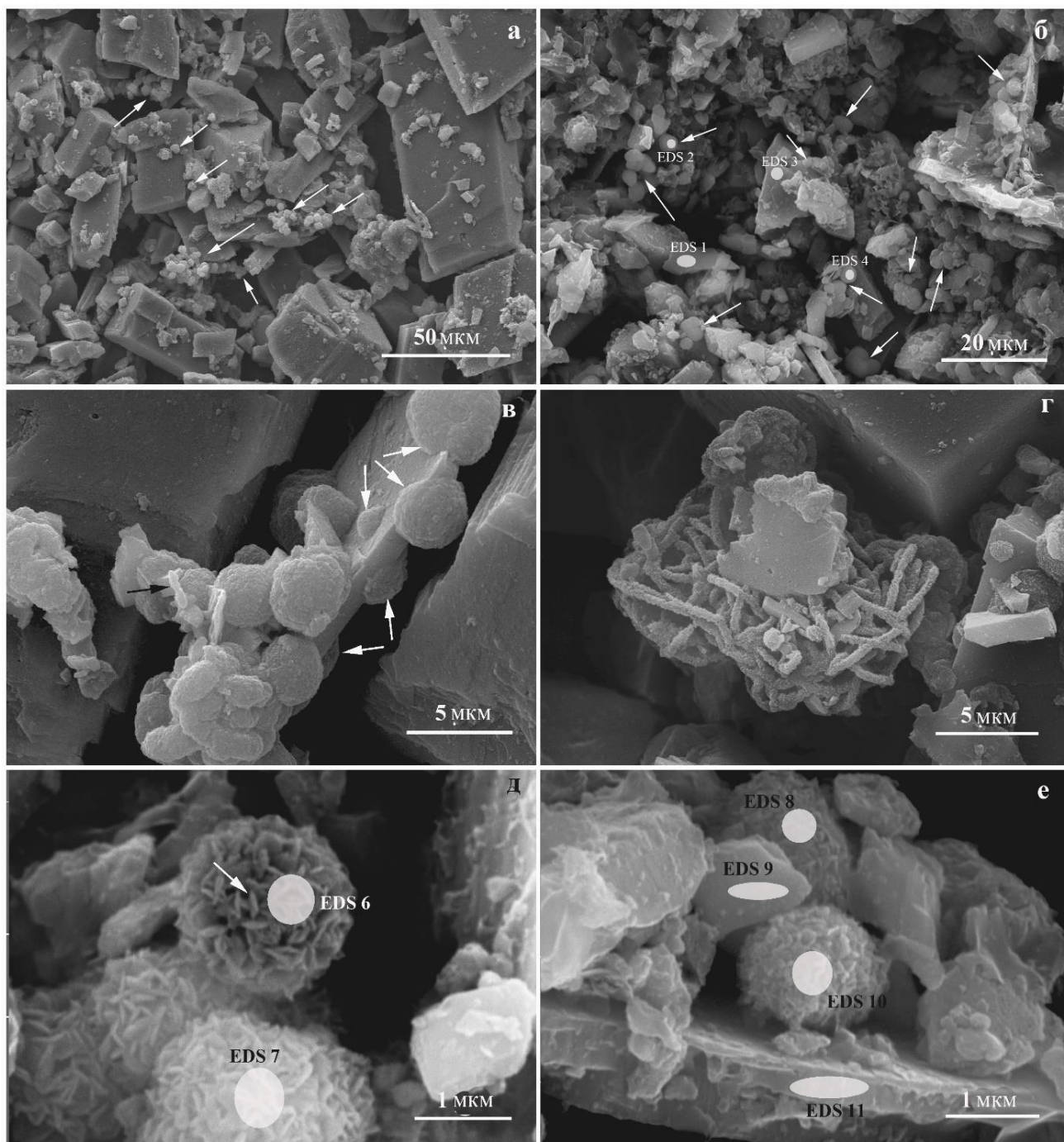


Рисунок 54. СЭМ-микрофотографии минеральной фазы, отобранной из ферментера после окончания эксперимента: а, б - общий вид частиц гидротермального сидерита с новообразованными сферолитами биогенного сидерита (белые стрелки); белыми овалами указаны места EDS-анализа (Таблица 18); в - сферолиты биогенного сидерита, сформированные на поверхности гидротермального сидерита (белые стрелки) и бактериальная клетка (черная стрелка); г - бактериальные клетки, инкрустированные минералами; д, е - тонкая структура сферолитов биогенного сидерита, состоящего из мелких плоских кристаллов (белые овалы обозначают места EDS-анализа (Таблица 18).

Таблица 18. Данные EDS-анализа спектров, полученных из гидротермальных частиц сидерита и сферолитов, приведенных на рисунке 52. σ - популяционное стандартное отклонение.

	элементы	O		C		Fe		P	
	спектры	вес.%	σ	вес.%	σ	вес.%	σ	вес.%	σ
частицы гидротермального сидерита	EDS1	59.1	1.5	16.2	0	0	0.4	0	0
	EDS 3	62.5	0.9	20.6	0	0	0.3	0	0
	EDS 5	63.6	3.9	17.6	1.1	1.1	0.9	1.1	0.2
	EDS 9	65.5	4.3	21.9	1.5	1.5	0.7	1.5	0.2
	EDS 11	65.7	2.8	22.6	0	0	0.6	0	0
глобулы биогенного сидерита	EDS 2	52.5	2	12.7	2.9	2.9	0.8	2.9	0.1
	EDS 4	60.9	1.4	19	1.3	1.3	0.4	1.3	0.1
	EDS6	64.4	3.8	20.1	3.2	3.2	0.3	3.2	0.3
	EDS7	64.4	3.8	20.1	3.2	3.2	0.3	3.2	0.3
	EDS 8	65.9	3.8	18.5	2.2	2.2	0.5	2.2	0.2
	EDS10	66.2	3.8	19.9	2.1	2.1	0.4	2.1	0.2

Показания Eh, измеренные в средней части ферментера во время инкубации, колебались в пределах от -7 до -109 мВ (в сравнении со стандартным водородным электродом), что указывало на анаэробные условия в этой и нижележащей частях ферментера. Во время коротких периодов активного перемешивания культуры перед каждым отбором проб минеральные частицы поднимались в верхнюю часть биореактора и осаждались на его стеклянные стенки и вращающиеся лопасти. Нижняя граница осадка, скопившегося на стеклянных стенках (Рис.55), а также результаты измерения Eh в верхней части ферментера в конце инкубации (+30 мВ против SHE) указывали на существование оксиклина. Минеральный осадок, собранный с поверхности стенок ферментера и лопасти был проанализирован с помощью Мёссбауэровской спектроскопии, которая показала, что он состоит из смеси гидротермального сидерита и вновь образованных фаз: микрочастиц гематита ($18.9 \pm 0,6\%$), фужерита ($17.5 \pm 2,8\%$) и неидентифицированной фазы, содержащей Fe(III) ($10.6 \pm 0.5\%$). Мёссбауэровская спектроскопия не выявила изменений в исходной минеральной фазе сидерита в инкубируемых одновременно с опытом стерильных контролях, несмотря на зафиксированное присутствие O₂ (2 об.%) в газовой фазе. Ни в ферментере, ни в контроле не было обнаружено HCl-экстрагируемых форм железа. pH среды в ферментере и контроле не менялся в течение всего времени инкубации.

Таблица 19. Обобщенные микробиологические и минералогические параметры в ферментере за 56-дневный инкубационный период.

сутки	численность, клетки/мл	филогенетический состав микробного сообщества, %	ацетат, мМ	состав минеральной фазы, %
0	3.0×10^5	<i>Carboxydotherrmus</i> (69), <i>Fervidobacterium</i> (11), <i>Thermanaerothrix</i> (6), <i>Thermodesulfovibrio</i> (4), <i>Thermoanaerobaculum</i> (1), <i>Paludibaculum</i> (0.3), <i>Chthonomonadales</i> (0.07)	0	ГС (100)
7	1.0×10^7	ND	0.01	ГС (100)
14	1.1×10^7	<i>Carboxydotherrmus</i> (5), <i>Fervidobacterium</i> (0.5), <i>Thermanaerothrix</i> (90), <i>Thermodesulfovibrio</i> (2), <i>Thermoanaerobaculum</i> (0.7), <i>Paludibaculum</i> (1), <i>Chthonomonadales</i> (0.06)	0.06	ГС (91) БС (5), М (4)
21	0.9×10^7	НД	НД	ГС (90), БС(6), М (4)
28	1.9×10^7	<i>Carboxydotherrmus</i> (0.1), <i>Fervidobacterium</i> (0.04), <i>Thermanaerothrix</i> (98), <i>Thermodesulfovibrio</i> (0.5), <i>Thermoanaerobaculum</i> (0.09), <i>Paludibaculum</i> (0.5), <i>Chthonomonadales</i> (0.1)	0.12	ГС (80), БС(13), М (7)
35	2.5×10^7	НД	НД	ГС (79), БС (15), М (6)
42	7.6×10^7	<i>Carboxydotherrmus</i> (0.3), <i>Fervidobacterium</i> (0.5), <i>Thermanaerothrix</i> (80), <i>Thermodesulfovibrio</i> (9), <i>Thermoanaerobaculum</i> (0.1), <i>Paludibaculum</i> (5), <i>Chthonomonadales</i> (4), <i>Thermaerobacter</i> (2)	0.21	ГС (79), БС(17), М (4)
49	2.6×10^7	НД	0.09	ГС (75), БС (18), М (7)
56	0.9×10^7	<i>Carboxydotherrmus</i> (0.2), <i>Fervidobacterium</i> (0.5), <i>Thermanaerothrix</i> (79), <i>Thermodesulfovibrio</i> (7), <i>Thermoanaerobaculum</i> (0.5), <i>Paludibaculum</i> (6), <i>Chthonomonadales</i> (4), <i>Thermaerobacter</i> (3)	0.1	ГС (70), БС (23), М (7)

Сокращения: НД -нет данных; ГС-гидротермальный сидерит; БС-биогенный сидерит; М-магнетит

Результаты, полученные в ферментере, позволили выявить некоторые особенности процесса трансформации гидротермального сидерита, которые не могли быть зафиксированы в малых объемах. С одной стороны, было подтверждено, что исследуемое термофильное микробное сообщество может развиваться за счет анаэробного окисления закисного железа,

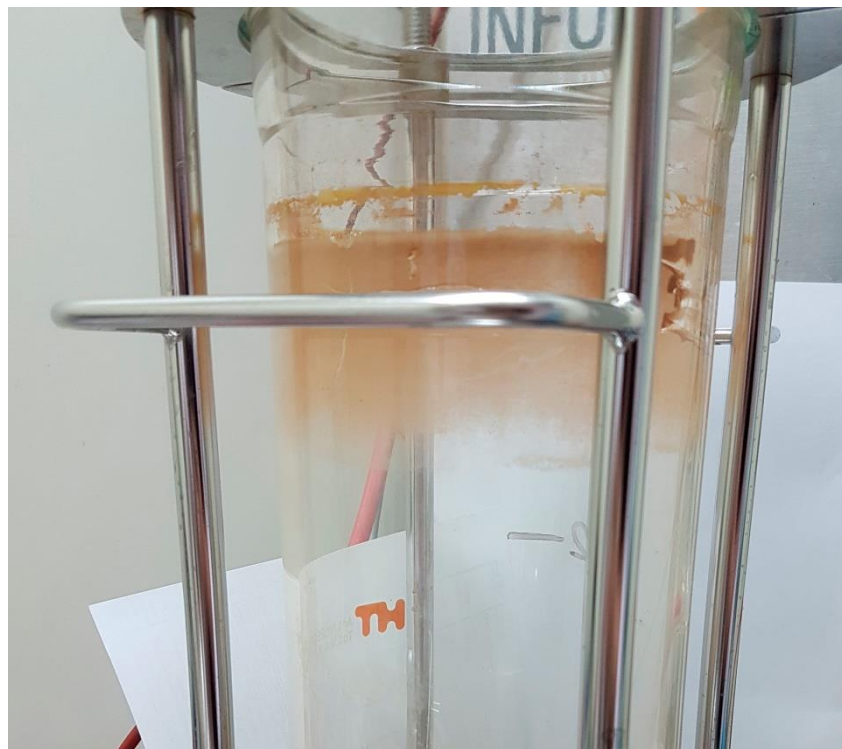


Рисунок 55. Фотографии пустого ферментера до начала эксперимента (слева) и после окончания инкубации (справа) с минеральной фазой, осажденной на верхней части стенок (нижняя граница осадка соответствует границе оксиклина)

входящего в структуру гидротермального сидерита. С другой стороны, условия, воспроизведенные в ферментере, а именно поддержание постоянной концентрации CO_2 в жидкой среде и наличие микроокислительной зоны вблизи границы раздела газ-жидкость, малый объем газовой фазы, существенно повлияли как на филогенетический состав сообщества - среди облигатных анаэробов появились бактерии рода *Thermaerobacter*, способные к аэробному росту, так и на продукты трансформации сидерита.

Проведенные термодинамические расчеты изменения свободной энергии Гиббса для условий эксперимента ($T=60\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH}=6,8$, $f(\text{CO}_2)=0.2$ бар, $[\text{ацетат}]=0.001$ моль) показали, что сидерит нестабилен и может быть окислен анаэробными термофилами посредством следующей реакции:



$$\Delta G_r^\circ = +73.1 \text{ кДж/моль}; \Delta G_r^{\text{exp}} = -33.90 \text{ кДж/моль}$$

Расчетное равновесное значение летучести CO_2 соответствовало значению 0.52 бар и позволяло сосуществовать сидериту и магнетиту, но ограничивало дальнейшее окисление сидерита. При более высокой летучести CO_2 магнетит становится нестабильным (Рис.56), что

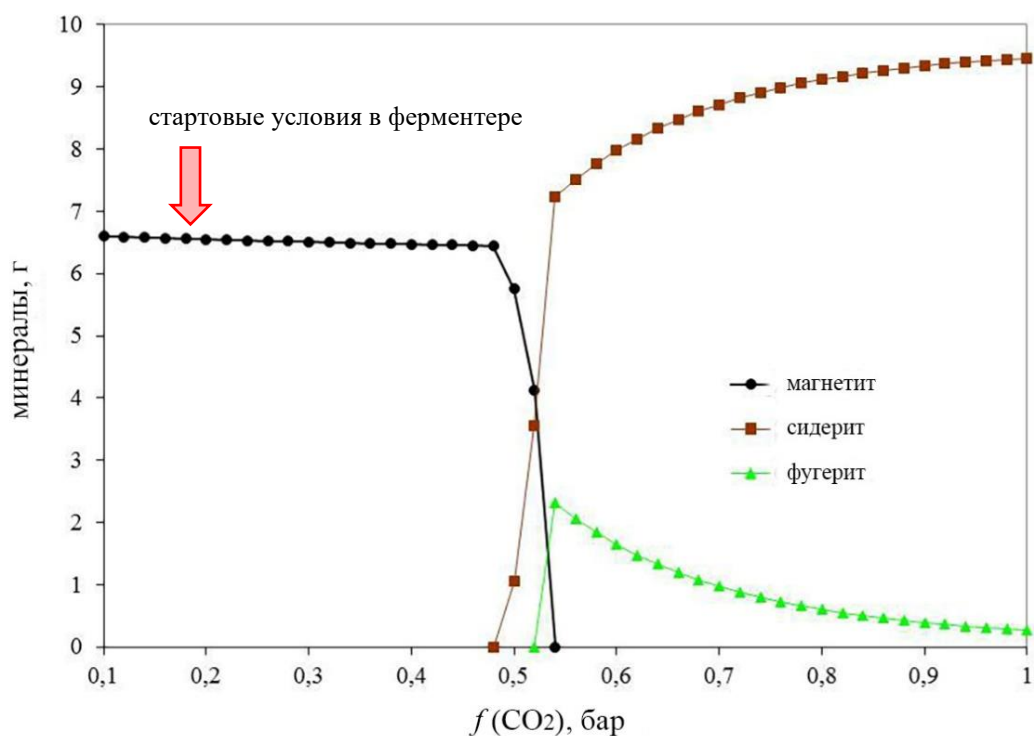


Рисунок 56. Термодинамические расчеты равновесных минеральных ассоциаций при $f(\text{CO}_2)$ от 0.1 до 1.0 бар, проведенные для экспериментальных условий. При начальной фугитивности CO_2 (0.2 бар) (стрелка) сидерит не является стабильным. При фугитивности углекислого газа более 0.52 бар сидерит снова становится стабильным.

означало возможность осуществления обратной реакции восстановления магнетита в сидерит. Причиной этого процесса могло быть локальное увеличение давления CO_2 в осадке, вызванное его накоплением при анаэробном окислении сидерита. Эта обратная реакция могла осуществляться органотрофными железовосстанавливающими микроорганизмами родов *Carboxydotherrmus*, *Thermodesulfovibrio*, *Thermoanaerobaculum* или *Paludibaculum*, которые могли использовать новообразованный ацетат или биомассу автотрофов в качестве донора электронов. Новообразованный сидерит в биореакторе кристаллизовался в виде сферических агрегатов, идентичных тем, которые мы наблюдали в накопительной культуре (Рис.51) и сильно отличался от частиц измельченного гидротермального сидерита (Рис.54).

Учитывая эти факты и термодинамические расчеты, мы предполагаем образование биогенного сидерита как наиболее вероятный процесс, замыкающий цикл железа, осуществляемый сформировавшимся термофильным микробным сообществом (Рис.57). Важно отметить, что содержание новообразованного сидерита увеличивалось в течение инкубации, в то время как относительное содержание магнетита оставалось практически постоянным (Рис.53), что означает, что бактерии действовали как конвейер, преобразующий

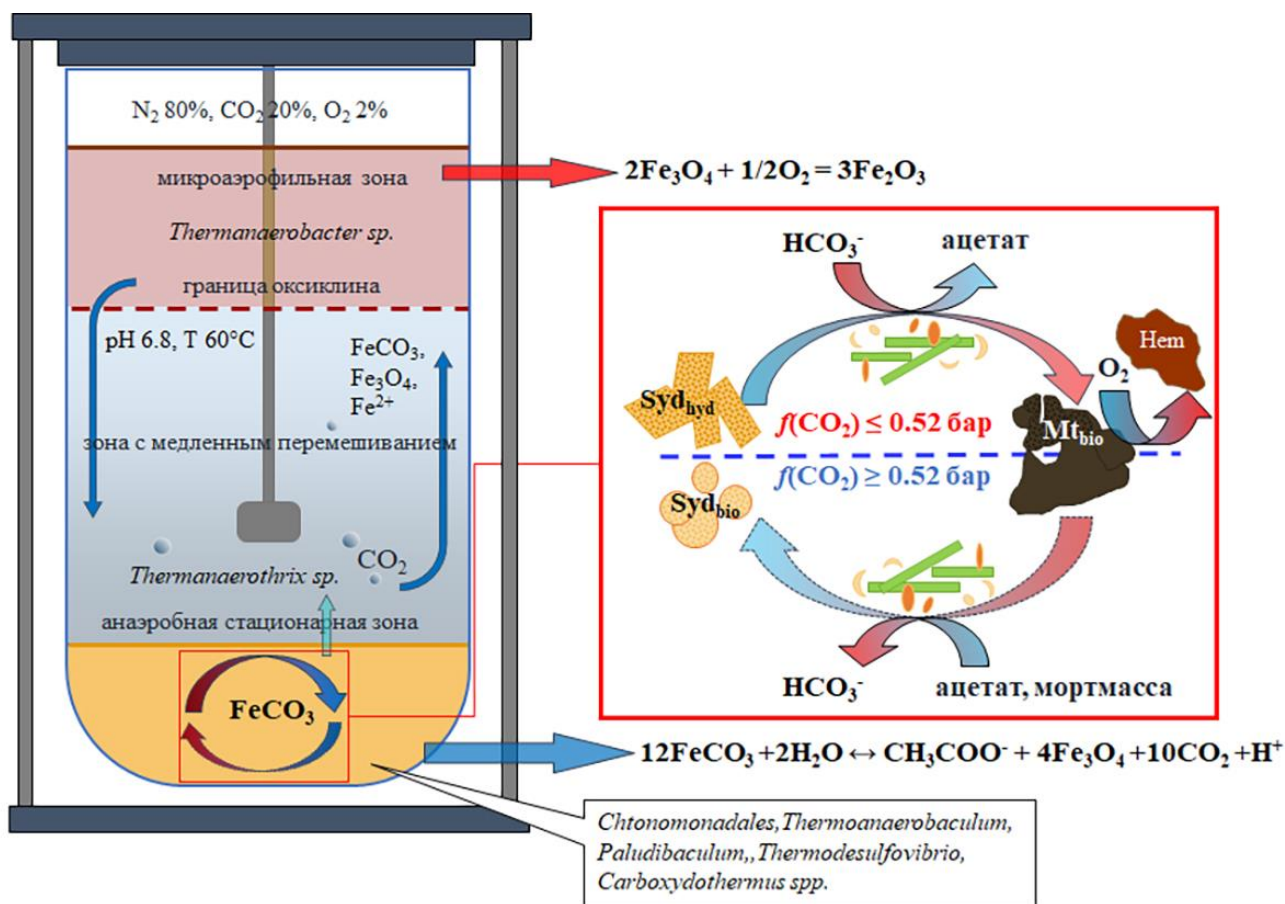


Рисунок 57. Схематическое изображение предлагаемых процессов в ферментере. Сокращения: Sid_{hyd} - гидротермальный сидерит; Sid_{bio} - биогенный сидерит; Mt_{bio} - биогенный магнетит; Hem - гематит; красный квадрат - анаэробный цикл железа, осуществляемый термофильным микробным сообществом на дне ферментера в минеральном осадке.

гидротермальный сидерит в новый сидерит с магнетитом и ацетатом в качестве промежуточных продуктов. Скорость диффузии углекислого газа в минеральной и жидкой фазах и метастабильность сидерита, по-видимому, служат главным переключателем этого цикла, включая или выключая образование магнетита (Рис.56, 57).

Осаждение гематита, произошедшее в верхней части биореактора на границе раздела вода-газ (Рис.55), было вызвано окислением частиц магнетита и сидерита, поднятых в микроаэрофильную зону ферментера. Гематит, являясь термодинамически стабильной фазой, накапливался в качестве вторичного минерала в ходе эксперимента и, скорее всего, не участвовал в круговороте железа под действием анаэробного микробного сообщества из-за своей низкой биодоступности в качестве акцептора электронов.

Сформировавшийся в ходе экспериментов высокоспециализированное анаэробное термофильное микробное сообщество было способно расти без аллохтонного органического

вещества, используя энергию окисления сидерита, с CO_2 в качестве акцептора электронов и ацетатом в качестве восстановленного продукта. Скорость трансформации сидерита, рассчитанная по данным Мёссбауэровской спектроскопии была высокой: за один день 0.5% от исходного количества гидротермального сидерита преобразовывалось в магнетит, гематит и биогенный сидерит. Органические вещества, образующиеся в этом процессе, т.е. ацетат и биомасса клеток, служили донорами электронов для восстановителей железа, что делало возможным дальнейшее биогенное преобразование магнетита. Этот цикл привел к накоплению органического вещества (анализ НАWK показал накопление 123 мг общего органического углерода в виде малодоступного к разложению керогена) и смеси окисленных минералов железа, магнетита и вторично образовавшегося гематита. Такой независимый от света и кислорода биологически-индуцированный цикл железа - от сидерита к сидериту - мог служить основой биогеохимических преобразований в древней биосфере, подобно тому, как цикл углерода с основными реакциями окислительного фотосинтеза и дыхания является центральным биогеохимическим циклом в биосфере, после появления кислорода в атмосфере 2.4 млрд. лет назад. Накопление основной минеральной ассоциации железа, характерного для железисто-кремнистых формаций докембрия - гематита, магнетита и сидерита, может происходить из-за разницы в скорости микробного окисления сидерита и восстановления магнетита, а также из-за низкой биодоступности гематита, наглядно продемонстрировало возможную роль анаэробных бактерий в образовании этих формаций, имеющих первостепенное значение, как основной источник железных руд.

Проведенные нами эксперименты, наглядно продемонстрировали возможность развития анаэробных микробных сообществ в автотрофных условиях за счет трансформации минералов железа. Несмотря на низкий энергетический выход многих химических реакций, связанных с окислением или восстановлением минералов железа, повсеместная доступность обуславливает их глубокую вовлеченность в биогеохимический цикл железа, не только в «нормальных» условиях зоны гипергенеза, но и в экстремальных местообитаниях в условиях повышенных значений рН и температуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований удалось существенно расширить знания об анаэробных алкалофильных бактериях, населяющих содовые озера, и их участии в биогеохимическом цикле железа. Были выделены и узаконены 7 новых таксонов облигатно алкалофильных прокариот, в том числе 3 новых рода. Впервые была продемонстрирована способность алкалофильных бактерий к хемолитоавтотрофному росту с использованием нерастворимых минералов железа в качестве акцепторов или доноров электронов. Способность этой метаболической группы вторичных анаэробов использовать также соединения серы (элементную серу или тиосульфат) в качестве акцепторов электронов, отражает их адаптацию к химическим условиям, существующим в анаэробных осадках современных содовых озер с доминированием круговорота серных соединений, осуществляемым анаэробным микробным сообществом. В то же время, проведенные нами эксперименты убедительно продемонстрировали, что исключение из щелочных минеральных сред соединений серы, прежде всего, сульфата, и добавление минералов железа приводит к накоплению филогенетически разнообразных прокариот, способных как к диссимиляционным процессам восстановления/окисления железа, так и к процессам облегченного брожения, при которых трехвалентное железо используется как акцептор для сбрасывания избыточных электронов. Таким образом, удалось показать, что ничтожная растворимость железа в щелочных условиях не является препятствием, как полагали ранее (Ye et al., 2004), для использования этого элемента в реакциях хемосинтеза анаэробными прокариотами, но обуславливает специфичность этого процесса, фактически, сводясь к микроб-минеральным взаимодействиям с полным исключением растворимых форм железа.

Термодинамическая устойчивость минеральных фаз железа обусловлена химическими свойствами этого элемента, а именно его чувствительностью к окислительно-восстановительным условиям среды и pH. При отрицательных значениях окислительно-восстановительного потенциала среды и $pH \geq 8.0$, характерным для анаэробных осадков содовых озер, многие минералы железа находятся в метастабильном состоянии, устойчивость которого обуславливается, прежде всего, кинетическими факторами. Эти условия оказываются благоприятными для вовлечения этих минералов в окислительно-восстановительные реакции, осуществляемые алкалофильными бактериями. Проведенные нами экспериментальные исследования показали, что анаэробные микроорганизмы успешно используют железо, входящее в состав минералов различных классов (окислов, карбонатов, силикатов) и в качестве акцептора, и в качестве донора электронов, как в чистых, так и в бинарных культурах. Магнетит и фужерит являются основными продуктами, образующимися

как в случае восстановления, так и в случае окисления микробной трансформации минералов железа в щелочных анаэробных карбонатных средах.

Наши работы позволили выявить новый процесс анаэробного окисления закисного железа не зависящего от света и нитрата, с образованием ацетата в качестве восстановленного продукта. В результате этого процесса, осуществляемого алкалофильными бактериями *Dethiobacter alkhaliphilus* и *Geoalkalibacter ferrihydriticus* как в чистой культуре, так и в составе бинарных культур, основанных на метабиотических или синтрофных взаимодействиях, происходило анаэробное окисление силикатов (биотит, глауконит) и карбонатов (сидерит) железа, сопровождающееся накоплением магнетита и/или фужерита и ацетата. Детальное исследование взаимодействий, происходящих в культуре, состоящей из облигатно-синтрофной бактерии *Ca. "Contubernalis alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* в присутствии минералов железа разной степени окисленности и этанола, позволило, с одной стороны, выявить ведущую роль механизма прямого межвидового переноса электронов обуславливающего развитие этой культуры, с другой стороны, показало, что трансформация восстановленных минералов железа (магнетит и сидерит) дает значительное преимущество в росте облигатному синтрофу. Более того, был выявлен новый тип взаимодействий, когда при возможной конкуренции этих бактерий за первичный субстрат (этанол) *G. ferrihydriticus* на определенном этапе переключался с органотрофной железоредукции на синтрофные взаимодействия, обеспечивая, таким образом, возможность роста *Ca. "C. alkalaceticum"*. Полученные результаты существенно расширяют знания о межвидовых взаимодействиях в анаэробных микробных сообществах и показывают возможность существования синтрофных культур, развивающихся за счет трансформации минералов железа при активном использовании механизма прямого переноса электронов.

Проведенные экспериментальные исследования микробно-индуцированной анаэробной коррозии стали в щелочных карбонатных средах, обусловленной деятельностью *G. ferrihydriticus*, показали возможность осуществления этого процесса. Нами было показано, что исследуемый микроорганизм активно корродирует стальную проволоку, в результате чего происходит образование водорода и накопление карбонатов железа – фужерита и сидерита. Анализ генома *G. ferrihydriticus* позволяет предположить, что основным процессом является прямое использование металлического железа в качестве донора электронов. В качестве акцептора электронов выступают протоны, которые восстанавливаются бактерией в молекулярный водород при помощи [NiFe]-гидрогеназ, активное вовлечение которых возможно при наличии цитохромов *c3*-типа, присутствующих в геноме *G. ferrihydriticus*.

Полученные результаты имеют принципиальное значение при оценке риска разрушения железобетонных конструкций, а также выработке эффективных мер борьбы с этим процессом, т.к. при реакции бетона с водой происходит существенное защелачивание среды и, значит, создаются благоприятные условия для развития анаэробной алкалофильной микрофлоры.

Экспериментальные работы, проведенные нами как с алкалофильными, так и с термофильными микробными сообществами показали возможность автономного существования экстремофилов в исходно автотрофных условиях, с использованием в качестве источника энергии восстановленных минералов железа. Было показано, что в этих условиях на свету филогенетически разнообразное микробное сообщество алкалофильных анаэробов редуцируется до бинарной культуры, состоящей из аноксигенной пурпурной бактерии и ацетогенной бактерии, которые образуют исключительно стабильную ассоциацию. При этом удалось показать неизвестную ранее способность *Ectothiorodospira shaposhnikovii* использовать закисное железо в качестве донора электронов. Ацетогенная бактерия, представляющая собой новый род в семействе *Natronincolaceae* и, по-видимому, развивающаяся за счет мортмассы фототрофа, существенно стимулировала его развитие за счет фотозависимого окисления ацетата, используемого пурпурной бактерией в качестве дополнительного донора электронов. Важно отметить, что оба процесса – аноксигенное фотозависимое окисление железа и ацетогенез – рассматриваются учеными как древнейшие реакции, осуществляемые прокариотами на этапах раннего развития биосферы Земли.

Исключительно важным результатом, значительно расширяющим знания о возможных процессах, осуществляемых прокариотными сообществами на этапе доминирования биогеохимического цикла железа, зафиксированного массовым образованием железисто-кремнистых формаций докембрия (3.2-1.8 млрд лет), стали эксперименты с термофильным анаэробным сообществом, анаэробно окисляющим сидерит в автотрофных условиях. Наши эксперименты ясно показали возможность циклической трансформации сидерита за счет разнонаправленных микробных процессов, в результате которых происходило накопление типоморфных минералов железистых кварцитов – магнетита, гематита и сидерита, а также ацетата. Описанный нами анаэробный микробный цикл может иметь принципиальное значение для периода накопления железисто-кремнистых формаций докембрия, так как, в отличие от фото- или нитрат-зависимого железоокисления, он не ограничен доступностью акцепторов электронов, поскольку парциальное давление CO_2 и содержание карбонатов никогда не опускались ниже современного уровня на протяжении всей геологической истории Земли. Осуществляемая анаэробными термофилами циклическая трансформация сидерита

представляет собой один из процессов, которые могли бы управлять биогеохимическими циклами углерода и железа в ранней биосфере Земли, а также в современной подземной биосфере. Высокая доступность восстановленного железа и CO_2 компенсирует низкую энергетическую эффективность карбонат-зависимого окисления сидерита и при изменении парциального давления CO_2 делает возможным обратный процесс восстановления магнетита, во многом имея сходство с взаимопротивоположными реакциями окислительного фотосинтеза и дыхания, являющихся основными движущими силами в современном биогеохимическом цикле углерода.

Результаты проведенных исследований расширили знания о филогенетическом и фенотипическом разнообразии алкалофильных анаэробных бактерий, характере их взаимодействий в микробных сообществах, а также позволили существенно расширить представления о роли бактерий в трансформации минералов железа в щелочных анаэробных условиях и их участии в биогеохимическом цикле железа (Рис.58). Представленная схема наглядно демонстрирует, что анаэробные алкалофильные бактерии способны осуществлять циклические трансформации минералов железа, получая энергию, как от восстановления трехвалентного железа, так и от окисления его двухвалентной формы или металлического железа. В последних случаях они выступают как продуценты ацетата или водорода.

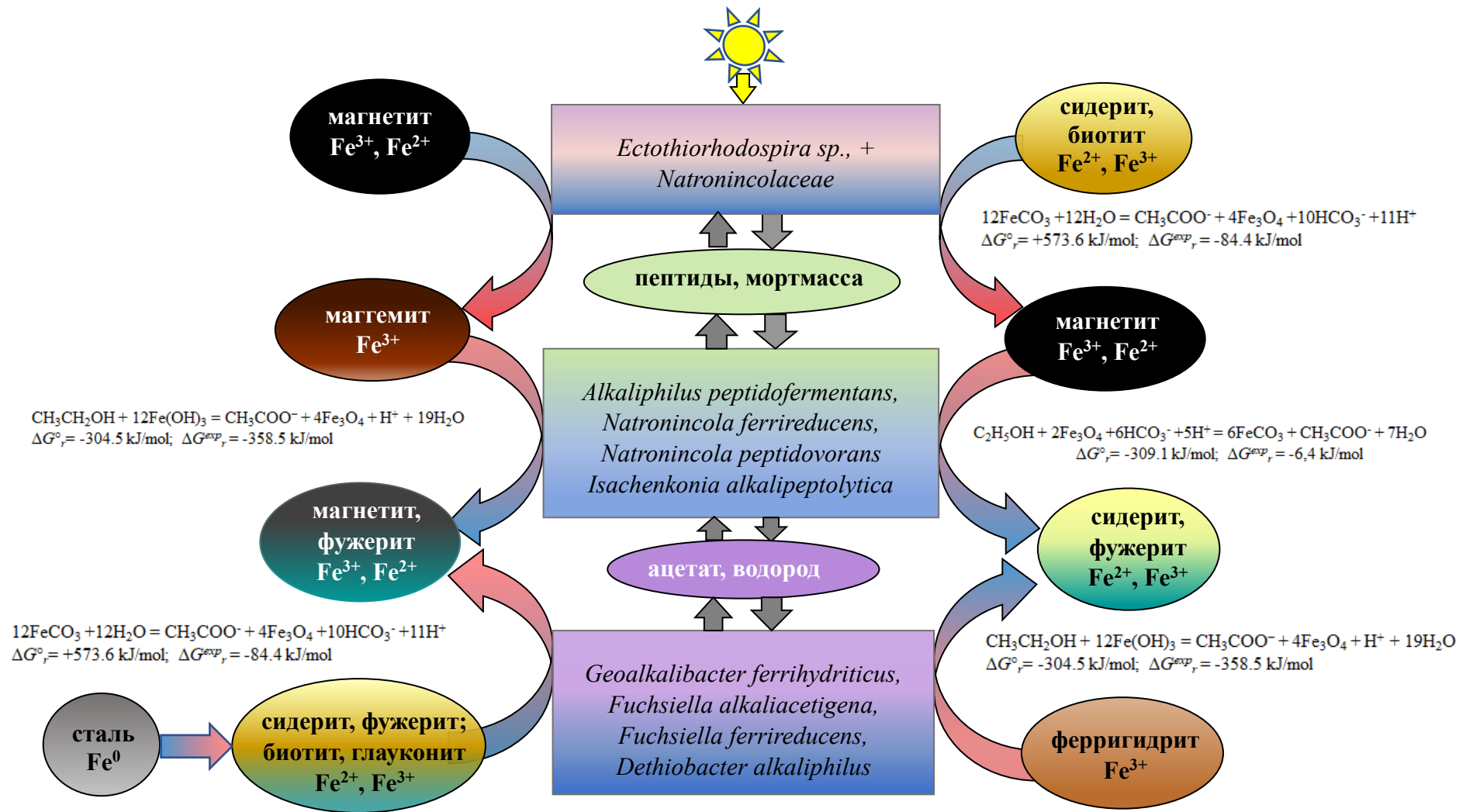


Рисунок 58. Схематическое обобщение, полученных экспериментальных данных, демонстрирующих взаимодействие акалофильных анаэробных бактерий из содовых озер с минералами железа.

ВЫВОДЫ

1. Расширены знания о филогенетическом и физиологическом разнообразии алкалофильных анаэробных прокариот. Описаны и узаконены 7 новых таксонов алкалофильных анаэробных бактерий, использующих соединения железа в качестве доноров или акцепторов электронов в энергетическом метаболизме - *Geoalkalibacter ferrihydriticus* gen. nov., sp. nov., *Fuchsiella alkaliacetigena* gen. nov., sp. nov., *Fuchsiella ferrireducens* sp. nov., или в процессе облегченного брожения - *Natronincola ferrireducens* sp. nov., *Natronincola peptidovorans* sp. nov., *Alkaliphilus peptidifermentans* sp. nov., *Isachenkonina alkalipeptolytica* gen. nov., sp. nov.
2. Выделены в чистую культуру и охарактеризованы первые хемолитоавтотрофные облигатно алкалофильные бактерии (*Geoalkalibacter* gen. nov., *Fuchsiella* gen. nov.), использующие нерастворимые минералы железа в качестве акцепторов или доноров электронов.
3. Доказана способность к прямому восстановлению нерастворимых соединений железа у шести из семи протестированных таксонов алкалофильных литотрофных сульфидогенов, что указывает на широкое распространение этого физиологического свойства у данной группы организмов, а значит, и на существенно более тесную, чем считалось ранее, взаимосвязь биогеохимических циклов серы и железа в анаэробных осадках содовых озёр.
4. Обнаружен микробный процесс анаэробного окисления закисного железа, входящего в состав силикатов или карбонатов, в отсутствии света или нитрата, сопровождающийся образованием магнетита и ацетата в качестве окисленного и восстановленного продуктов. Автотрофные микроорганизмы, осуществляющие этот процесс, могут служить первичными продуцентами органического вещества.
5. Показана способность анаэробных бактерий, относящихся к родам *Geoalkalibacter* и *Dethiobacter* осуществлять как восстановление, так и окисление минералов железа. Полученные данные позволяют пересмотреть экологическую роль железоредуцирующих бактерий, которые ранее рассматривались как участники только восстановительной части биогеохимического цикла железа.
6. Впервые продемонстрирована возможность существования синтрофной культуры, развивающейся за счет трансформации минералов железа, обусловленной в основном механизмом прямого межвидового переноса электронов, в которой облигатный синтроф получает энергетическое преимущество над гидрогенотрофным партнером. Полученные данные существенно расширяют представление об экологической роли

синтрофных взаимодействий в микробных сообществах и вовлечении их в трансформацию минералов железа.

7. Впервые продемонстрирована возможность процесса анаэробной микробно-индуцированной коррозии стали в карбонатной среде при $\text{pH} \geq 9.0$ в отсутствие органики. Показано, что основным процессом, приводящим к разрушению стали в этих условиях, осуществляемым *Geoalkalibacter ferrireducens*, является диссимиляционное окисление металлического железа в закисное с использованием протонов воды в качестве акцепторов электронов, сопровождающееся выделением водорода. Полученные данные имеют принципиальное значение для оценки возможности рисков разрушения железобетонных конструкций и выработки мер по борьбе с этим явлением.
8. Впервые продемонстрирована возможность существования алкалофильного микробного сообщества, развивающегося за счет аноксигенного фотозависимого окисления минералов железа. Показана неизвестная ранее способность аноксигенной пурпурной бактерии *Ectothiorodospira shaposhnikovii* использовать закисное железо в качестве донора электронов.
9. Показано, что микробное сообщество термофильных бактерий может успешно развиваться в автотрофных условиях за счет преобразования сидерита, осуществляя его циклическую трансформацию, в которой ацетат и магнетит являются промежуточными продуктами-медиаторами. Подобный цикл, неограниченный по ключевым соединениям, таким как, CO_2 и Fe^{2+} , мог играть ключевую роль в архее-протерозое, являясь центральным звеном древних биогеохимических циклов, подобно современному циклу углерода с основополагающими реакциями фотосинтеза-дыхания.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ: СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Албул С.П. Рудопоисковая гидрохимия. М. 1969. — 344 с.
2. Балашова В.В., Заварзин Г.А. Анаэробное восстановление окисного железа водородной бактерией // Микробиология. — 1979. — Т. 48. — С. 773–778.
3. Баталин Ю.В., Касимов Б.С., Станкевич Е.Ф. Месторождения природной соды и условия их образования. М.: Недра, 1973. — 208 с.
4. Батурин Г.Н. Геохимия железомарганцевых конкреций океана. / Г.Н. Батурин; отв. ред. И. И. Волков; АН СССР, Ин-т океанологии им. П. П. Ширшова// М., Наука, 1986. — 327 с.
5. Белов К.П. Аномалии магнитных свойств магнетита Fe₃O₄ P. Загадки магнетита // Соросовский образовательный журнал. — 2000. — Т. 6. — С. 71–76.
6. Белоусов П.Е., Чупаленков Н.М., Рудмин М.А., Крупская В.В. Месторождения глауконитов России: геологическая позиция, условия образования и перспективы освоения // Литология и полезные ископаемые. — 2022. — Т. 3. — С. 270–285.
7. Богашова Л.Г. Роль галогенных вод в формировании месторождений полезных ископаемых. М.: ГЕОС, 2007. — 168 с.
8. Бугаенко Л.Т., Рябых С.М., Бугаенко А.Л. Почти полная система средних ионных кристаллографических радиусов и ее использование для определения потенциалов ионизации // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. — 2008. — Т. 49. — С. 363–384.
9. Булах А.Г., Золотарев А.А., Кривовичев В.Г. Общая минералогия. М.: Академия, 2008. — 416 с.
10. Гаррелс Р.М., Крайст И.А. Растворы, минералы, равновесия. М.: Мир, 1968. — 368 с.
11. Герасименко Л. М. Алкалофильные кислородные фотосинтезирующие организмы. / В кн. Алкалофильные микробные сообщества // Труды ИНМИ. — 2007. — Т. 14. — С. 88–158.
12. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии. М.: Мир, 1983. — 536 с.
13. Горленко В.М. Аноксигенные фототрофные бактерии содовых озер. / В кн. Алкалофильные микробные сообщества // Труды ИНМИ. — 2007. — Т. 14. — С. 225–258.
14. Горленко В., Брянцева И., Самылина О., Ашикхмин А., Синетова М., Кострикина Н., Козяева В. Нитчатые аноксигенные фототрофные бактерии в микробных сообществах содовых озер Кулундинской степи (Алтайский край) // Микробиология. — 2020. — Т. 89. — С. 688–699.

15. Горленко В.М., Намсараев Б.Б., Кулырова А.В., Заварзина Д.Г., Жилина Т.Н. Активность сульфатредуцирующих бактерий в донных осадках содовых озер Юго-Восточного Забайкалья // Микробиология. — 1999. — Т. 68. — С. 580–586.
16. Деткова Е. Н. Осмоадаптация галоалкалофильных бактерий из содовых озер. / В кн. Алкалофильные микробные сообщества // Труды ИНМИ. — 2007. — Т.14.— С. 348–374.
17. Дриц В.А., Коссовская А.Г. Глинистые минералы: слюды, хлориты // М.: Наука, 1991. — 176 с.
18. Дубинина Г.А. Биология железобактерий и их геохимическая деятельность: диссертация. доктора биологических наук: 03.00.07. / АН СССР. Ин-т микробиологии. - Москва, 1977. — 448 с.
19. Жаркынбаева Р.А., Худайбергенова Э.М., Жоробекова Ш.Ж. Гидролиз железа и образование смешеннолигандных гумат-гидроксикомплексов в воде // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2022. — Т.7. — С. 78–82.
20. Железо-марганцевые корки и конкреции подводных гор Тихого океана. / [Ю. А. Богданов, О.Г. Сорохтин, Л.П. Зоненшайн и др.]; Отв. ред. А. П. Лисицын; АН СССР, Ин-т океанологии им. П. П. Ширшова// М.: Наука, 1990. — 228 с.
21. Жилина Т.Н., Заварзин Г.А. Методы выделения и культивирования метанообразующих бактерий // Теоретические и методические основы изучения анаэробных микроорганизмов. Пушино. НЦБИ АН СССР, 1978. — С. 68–90.
22. Жилина Т.Н., Заварзина Д.Г., Колганова Т.В., Турова Т.П., Заварзин Г.А. *Candidatus "Contubernalis alkalaceticum"* — облигатно синтрофная алкалофильная бактерия, анаэробно окисляющая ацетат в бинарной культуре с *Desulfonatronum cooperativum* // Микробиология. — 2005. — Т. 74. — С. 800–809.
23. 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. 75. — С. 642–653.
24. Жилина Т.Н., Заварзина Д.Г., Кевбрин В.В., Колганова Т.В. Описание *Methanocalculus natronophilus* sp. nov., алкалофильной гидрогенотрофной метанообразующей археи из содового озера и создание нового семейства *Methanocalculaceae* // Микробиология. — 2013. — Т. 82. — С. 681–690.
25. Заварзин Г.А. Эволюция прокариотной биосферы: Микробы в круговороте жизни: 120 лет спустя: Чтение им. С. Н. Виноградского. / Ред. Колотилова Н.Н// М.: МАКС Пресс, 2011. — 144 с.
26. Заварзин Г.А. Литотрофные микроорганизмы. М.: Наука, 1972. —330 с.

27. Заварзин Г.А. Образование содовых условий как глобальный процесс. / В кн. Алкалофильные микробные сообщества. Труды ИНМИ. — 2007. — Т. 14. — С. 41–63.
28. Заварзин Г.А., Жилина Т.Н., Дулов Л.Е. Алкалифильный сульфидогенез на целлюлозе в комбинированных культурах // Микробиология. — 2008. — Т. 77. — С. 471–482.
29. Заварзин Г.А., Жилина Т.Н., Пикута Е.В. Вторичные анаэробы в галоалкалофильных сообществах озер Тувы // Микробиология. — 1996. — Т. 65. — С. 546–553.
30. Заварзина Д.Г. Образование магнетита и сидерита термофильными железоредуцирующими бактериями // Палеонтологический журнал. — 2004. — Т. 6. — С. 3–8.
31. Заварзина Д.Г. (2013). Железоредукторы содовых озер - реликты железного века? // *Природа*. №9. С. 59–67.
32. Заварзина Д.Г., Жилина Т.Н. (2012). Анаэробные сообщества содовых озер как аналоги палеоконтинентальной микробиоты докембрия. С. 69–91 // Ранняя колонизация суши. Отв. ред. С. В. Рожнов Сер. “Гео-биологические процессы в прошлом“. Москва, ПИН РАН. 194с.
33. Калакуцкий Л.В., Дуда В.И. Изучение процесса восстановления железа в почве// Научн. Докл. Высшей Школы (Биол Науки). —1964. — Т. 1. — С.55-60.
34. Кевбрин В.В., Заварзин Г.А. Влияние соединений серы на рост галофильной гомоацетатной бактерии *Acetohalobium arabaticum* // Микробиология. — 1992. — Т. 61. — С. 812–817.
35. Ковда В.А. Биогеохимия почвенного покрова // М.: Наука, 1985. — 264 с.
36. Кондратьева Е.Н. Фотосинтезирующие бактерии и бактериальный фотосинтез. М.: МГУ, 1972. — 76 с.
37. Левченко Е.Н., Тигунов Л.П. Глаукониты России: состояние, перспективы освоения развития минерально-сырьевой базы // Минеральное сырье. Серия геолого-экономическая. М.: ВИМС, 2011. - Т. 32. - С. 65.
38. Лурье Ю.Ю. Унифицированные методы анализа вод. М.: Химия, 1971. — 375 с.
39. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Пер. с англ. под ред. А. А. Баева и К. Г. Скрябина. М.: Мир, 1984. — 480 с.
40. Мейсон Б. Основы геохимии. М.: Недра, 1971. — 311с.
41. Николаева И. В. Минералогия и геохимия глауконита. Новосибирск: СО РАН СССР, 1981. — 111 с.
42. Перельман А.И. Геохимия. М.: Высш. школа, 1989. — 528 с.
43. Перфильев Б.В. Микроразнональное строение иловых озерных отложений и методы его исследования. Л.: Наука, 1972. — 216с.

44. Пикута Е.В., Жилина Т.Н., Заварзин Г.А., Кострикина Н.А., Осипов Г.А., Рейни Ф.А. *Desulfonatronum lacustre* gen. nov., sp. nov. - новая алкалофильная сульфат восстанавливающая бактерия, использующая этанол // Микробиология. — 1998. — Т. 67. — С. 123–131.
45. Пиневиц А.В. Микробиология железа и марганца. СПб.: СПбГУ, 2005. — 373 с.
46. Пушева М.А. Особенности энергетического метаболизма экстремально галоалкалофильных анаэробных прокариот. / В кн. Алкалофильные микробные сообщества // Труды ИНМИ. — 2007. — Т.14. — С. 323–348.
47. Ронов А.Б., Ярошевский А.А., Мигдисов А.А. Химическое строение земной коры и геохимический баланс главных элементов. М.: Наука, 1990. — 183 с.
48. Савенко В.С. Почему не растворяются глубоководные железомарганцевые конкреции? // Океанология. — 1989. — Т. 29. — С. 270–273.
49. Савенко В.С. Физико-химический анализ процессов формирования железомарганцевых конкреций в океане. М.: ГЕОС, 2004. — 156 с.
50. Самылина О.С., Герасименко Л.М., Шадрин Н.В. Сравнительная характеристика фототрофных сообществ в минеральных озерах Крыма (Украина) и Алтайского края (Россия) // Альгология. — 2010. — Т. 20. — С. 192–209.
51. Самылина О.С., Сапожников Ф.В., Гайнанова О.Ю., Рябова А.В., Никитин М.А., Сорокин Д.Ю. Альго-бактериальные сообщества содовых озер Кулундинской степи (Алтайский край, Россия) // Микробиология. — 2015. — Т. 84. — С. 107–119.
52. Слободкин А.И. Термофильная микробная металлоредукция // Микробиология. — 2005. — Т. 74. — С. 581–595.
53. Слободкин А.И., Ерощев-Шак В.А., Кострикина Н.А., Лаврушин В. Ю., Дайняк Л.Г., Заварзин Г.А. Образование магнетита термофильными анаэробными микроорганизмами // Доклады Академии Наук. — 1995. — Т. 345. — С. 694–697.
54. Страхов Н.М. Железорудные фации и их аналоги в истории Земли: Опыт. ист.-геол. анализа процесса осадкообразования. М.: АН СССР, 1947. — 268 с.
55. Страхов Н.М. Типы литогенеза и их эволюция в истории Земли. М.: ГОНТИ, 1963. — 535 с.
56. Сысуев В.В. Железо. В кн.: Круговорот вещества в природе. М.: МГУ, 1980, — С. 118–131.
57. Труды ИНМИ им. С. Н. Виноградского. / Вып. 14: Алкалофильные микробные сообщества. Отв. ред. В. Ф. Гальченко. М.: Наука. 2007. — 398с.
58. Труфанов А.И. Формирование железистых подземных вод. М.: Наука, 1982. — 135 с.
59. Холодов В.Н., Бутузова Г.Ю. Проблемы сидеритообразования и железорудные эпохи. Сообщение 1. Типы сидеритосодержания железорудных месторождений // Литология и полез. ископ. — 2004. — Т. 5. — С. 451–475.

60. Холодов В.Н., Бутузова Г.Ю. Проблемы сидеритообразования и железорудные эпохи. Сообщение 2. Общие вопросы фанерозойского железорудного процесса // Литология и полез. ископ. — 2004. — Т. 6. — С. 563–584.
61. Холодов В.Н., Недумов Р.И., Голубовская Е.В. Фациальные типы осадочных железорудных месторождений и их геохимические особенности. Сообщение 1: Фациальные группы осадочных руд, их литология и генезис // Литология и полез. ископ. — 2012. — Т. 6. — С. 503–531.
62. Чистякова Н.И., Русаков В.С., Заварзина Д.Г. Мессбауэровские исследования кинетики и условий образования минералов железа термофильными железоредукторами // Изв. РАН, сер. Физическая. — 2003. — Т. 67. — С. 1354–1358.
63. Чухров Ф.В., Звягин Б.Б., Горшков А.И., Ермилова Л.П., Балашова В.В. О ферригидрите // Изв. АН СССР. Сер. геол. — 1973. — № 4. — С. 23–33.
64. Alazard D., Badillo C., Fardeau M.L., Cayol J.L., Thomas P., Roldan T., Tholozan J.L., Ollivier B. *Tindallia texcoconensis* sp. nov., a new haloalkaliphilic bacterium isolated from lake Texcoco, Mexico // *Extremophiles*. — 2007. — Vol. 11. — P. 33-39.
65. Alikhanov R.A. Neutron diffraction investigation of the antiferromagnetism of the carbonates of manganese and iron // *Soviet Physics JETP-USSR*. — 1959. — Vol. 9. — P. 1204-1208.
66. Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., Lipman, D. Basic local alignment search tool // *J. Mol. Biol.* — 1990. — Vol. 215. — P. 403—410.
67. Aromokeye D.A., Richter-Heitmann T., Oni O. E., Kulkarni A., Yin X., Kasten S. Temperature controls crystalline iron oxide utilization by microbial communities in methanic ferruginous marine sediment incubations // *Front. Microbiol.* — 2018. — 9:2574.
68. Bach W., Paulick H., Garrido C. J., Idefonse B., Meurer W.P., and Humphris S.E. Unraveling the sequence of serpentinization reactions: petrography, mineral chemistry, and petrophysics of serpentinites from MAR 15°N (ODP Leg 209, Site 1274) // *Geophys. Res. Lett.* — 2006. — Vol. 33. — L13306.
69. Badalamenti J.P., Krajmalnik-Brown R., Torres C.I. Generation of high current densities by pure cultures of anode-respiring *Geoalkalibacter* spp. under alkaline and saline conditions in microbial electrochemical cells // *mBio*. — 2013. — Vol. 4. — e00144-13.
70. Badalamenti J.P., Krajmalnik-Brown R., Torres C.I., Bond D.R. Genomes of *Geoalkalibacter ferrihydriticus* Z-0531^T and *Geoalkalibacter subterraneus* Red1^T, two haloalkaliphilic metal-reducing *Deltaproteobacteria* // *Genome Announc.* — 2015. — Vol. 3. — e00039-15.
71. Bai Y., Mellage A., Cirpka O.A., Sun T., Angenent L.T., Haderlein S.B., Kappler A. AQDS and redox-active NOM enables microbial Fe(III)-mineral reduction at cm-scales // *Environ. Sci. Tech.* — 2020. — Vol.54. — P. 4131—4139.

72. Balland C., Poszwa A., Leyval C., Mustin C. Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity // *Geochim. Cosmochim. Acta.* — 2010. — Vol. 74. — P. 5478-5493.
73. Balogh-Brunstad Z., Keller C., Tom D., Stevens F., Li C.Y., Bormann B. Biotite weathering and nutrient uptake by ectomycorrhizal fungus *Suillus tomentosus* in liquid-culture experiments // *Geochim. Cosmochim. Acta.* — 2008. — Vol. 72. — P. 2601-2618.
74. Barrie Johnson D., Hallberg K.B. Carbon, iron and sulfur metabolism in acidophilic microorganisms // *Adv. Microb. Physiol.* — 2009. — Vol. 54. — P. 201-255.
75. Bekker A., Planavsky N.J. Krapež B. Iron formations: their origins and implications for ancient seawater chemistry // Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, Treatise on Geochemistry (2nd Edition). — 2014. — Vol. 9. — P. 561-628.
76. Bekker A., Slack J.F., Planavsky N., Krapez B., Hofmann A., Konhauser K.O., Rouxel O.J. Iron formation: the sedimentary product of a complex interplay among mantle, tectonic, oceanic, and biospheric processes // *Economic Geology.* — 2010. — Vol. 105. — P. 467-508.
77. Benson D.A., Boguski M., Lipman D.J., Ostell J., Ouellette B.F., Rapp B.A., Wheeler D.L. GenBank // *Nucleic. Acids. Res.* — 1999. — Vol. 27. — P. 12-17.
78. Bethke C.M., Sanford R.A., Kirk M.F., Jin Q., Flynn T.M. The thermodynamic ladder in geomicrobiology // *Am. J. Sci.* — 2011. — Vol. 311. — P. 183-210.
79. Biegel E., Muller V. Bacterial Na⁺-translocating ferredoxin: NAD⁺ oxidoreductase // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2010. — Vol. 107. — P. 18138-18142.
80. Biegel E., Schmidt S., Gonzalez J.M., Muller V. Biochemistry, evolution and physiological function of the Rnf complex, a novel ion-motive electron transport complex in prokaryotes // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2011. — Vol. 68. — P. 613-634.
81. Bird L.J., Saraiva I.H., Park S., Calçada E.O., Salgueiro C.A., Nitschke W., Louro R.O., Newman D.K. Non-redundant roles for cytochrome c2 and two high-potential iron-sulfur proteins in the photoferrotroph *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1 // *J. Bacteriol.* — 2014. — Vol. 196. — P. 850-858.
82. Birkett T. Handbook of Mineralogy. V. Borates, Carbonates, Sulfates. / By J.W. Anthony, R.A. Bideaux, K.W. Bladh and M.C. Nichols // Mineral Data Publishing, Inc., P.O. Box 37072, Tucson, Arizona 85740, U.S.A. — 2003. — ix 813 p.
83. Blättler C.L., Kump L.R., Fischer W.W., Paris G., Kasbohm J.J., Higgins J.A. Constraints on ocean carbonate chemistry and pCO₂ in the Archaean and Palaeoproterozoic // *Nat. Geosci.* — 2017. — Vol. 10. — P. 41-45.
84. Blöthe M., Roden E. Microbial iron redox cycling in a circumneutral pH groundwater seep // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2009a. — Vol. 75. — P. 468-473.

85. Blöthe M., Roden E. Composition and activity of an autotrophic Fe(II)-oxidizing, nitrate-reducing enrichment culture // *Appl. Environ. Microbiol.* —2009b. — Vol. 75. — P. 6937-6940.
86. Blöthe M., Wegorzewski A., Müller C., Simon F., Kuhn T., Schippers A. Manganese-cycling microbial communities inside deep-sea manganese nodules // *Environ. Sci. Technol.* — 2015. — Vol. 49. — P. 7692-7700.
87. Blum J.S., Bindi A.B., 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. — Vol. 171. — P. 19-30.
88. Bogg S. Iron-bearing sedimentary rocks. / In: *Principles of sedimentology and stratigraphy* 2-nd ed., Prentice Hall, // Englewood Cliffs, N.Y., 1995, — P. 256-266.
89. Bonneville S.C., Morgan D., Schmalenberger A., Bray A., Banwart, S., Benning L. Tree-mycorrhiza symbiosis accelerate mineral weathering: evidences from nanometer-scale elemental fluxes at the hypha—mineral interface // *Geochim. Cosmochim. Acta.* — 2011. — Vol. 75. — P. 6988-7005.
90. Bonneville, S., Behrends, T., Van Cappellen, P. Solubility and dissimilatory reduction kinetics of iron (III) oxyhydroxides: a linear free energy relationship // *Geochim. Cosmochim. Acta.* — 2009. — Vol. 73. — P. 5273—5282.
91. Bosch J., Lee K.Y., Jordan G., Kim K.W., Meckenstock R.U. Anaerobic, nitrate-dependent oxidation of pyrite nanoparticles by thiobacillus denitrificans // *Environ. Sci. Technol.* — 2012. — Vol. 46. — P. 2095-2101.
92. Bose A., Newman D.K. Regulation of the phototrophic iron oxidation (pio) genes in *Rhodospirillum rubrum* TIE-1 is mediated by the global regulator, FixK // *Mol. Microbiol.* — 2011. — Vol. 79. — P. 63-75.
93. Bose A., Gardel E.J., Vidoudez C., Parra E.A., Girguis P.R. Electron uptake by iron-oxidizing phototrophic bacteria // *Nat. Commun.* — 2014. — Vol. 5. — 3391.
94. Bose S., Hochella Jr., M.F., Gorby Y.A., Kennedy D.W., McCready D.E., Madden A.S., Lower B.H. Bioreduction of hematite nanoparticles by the dissimilatory Iron reducing bacterium *Shewanella oneidensis* MR-1 // *Geochim. Cosmochim. Acta.* — 2009. — Vol. 73. — P. 962-976.
95. Braterman P.S., Cairns-Smith A.G., Sloper R.W. Photo-oxidation of hydrated Fe²⁺ — significance for banded iron formations // *Nature.* — 1983. — Vol. 303. — P. 163-164.
96. Bray A.W., Oelkers E.H., Bonneville S., Wolff-Boenisch D., Potts N.J., Fones G., Benning L.G. The effect of pH, grain size, and organic ligands on biotite weathering rates // *Geochim. Cosmochim. Acta.* — 2015. — Vol. 164. — P. 127—145.
97. Brenner S., Horne R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1959. — Vol. 134. — P. 103-110.

98. Bromfield S.M. Reduction of ferric compounds by soil bacteria // *J. Gen. Microbiol.* — 1954. — Vol. 11. — P. 1-6.
99. Brons H.J., Hagen W.R., Zehnder A.J.B. Ferrous iron dependent nitric oxide production in nitrate reducing cultures of *Escherichia coli* // *Arch. Microbiol.* — 1991. — Vol. 155. — P. 341-347.
100. Brookshaw D., Lloyd J., Vaughan D., Patrick R. Bioreduction of biotite and chlorite by a *Shewanella* species // *American Mineralogist.* — 2014. — Vol. 99. — P. 1746-1754.
101. Brutinel E.D., Gralnick J.A. Shuttling happens: soluble flavin mediators of extracellular electron transfer in *Shewanella* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2012. — Vol. 93. — P. 41-48.
102. Bruun A., Finster K., Gunnlaugsson H., Nørnberg P., Friedrich M.W. A comprehensive investigation of iron cycling in a freshwater seep including microscopy, cultivation and molecular community analysis // *Geomicrobiol. J.* — 2010. — Vol. 27. — P. 15-34.
103. Bryce C., Blackwell N., Schmidt C., Otte J., Huang Y.M., Kleindienst S., Tomaszewski E., Schad M., Warter V., Peng C., Byrne J.M., Kappler A. Microbial anaerobic Fe(II) oxidation - ecology, mechanisms and environmental implications // *Environ. Microbiol.* — 2018. — Vol. 20. — P. 3462-3483.
104. Burgdorf T., van der Linden E., Bernhard M., Yin Q.Y., Back J.W., Hartog A.F., Muijsers A.O., de Koster C.G., Albracht S.P., Friedrich B. The soluble NAD⁺-Reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 consists of six subunits and can be specifically activated by NADPH // *J. Bacteriol.* — 2005. — Vol. 187. — P. 3122-3132.
105. Butler J.E., Young N.D., Lovley D.R. Evolution of electron transfer out of the cell: comparative genomics of six *Geobacter* genomes // *BMC Genomics.* — 2010. — Vol. 11. — 40 - DOI: 10.1186/1471-2164-11-40.
106. Byrne J.M., Klueglein N., Pearce C., Rosso K.M., Appel E., Kappler A. Redox cycling of Fe(II) and Fe(III) in magnetite by Fe-metabolizing bacteria // *Science.* — 2015. — Vol. 347. — P. 1473-1476.
107. Byrne J.M., van der Laan G., Figueroa A.I., Qafoku O., Wang C., Pearce C.I., Jackson M., Feinberg J., Rosso K.M., Kappler A. Size dependent microbial oxidation and reduction of magnetite nano- and micro-particles // *Sci. Rep.* — 2016. — 5:30969.
108. Camacho A., Walter X.A., Picazo A., Zopfi J. Photoferrotrophy: remains of an ancient photosynthesis in modern environments // *Front. Microbiol.* — 2017. — 8:323.
109. Canfield D.E., Poulton S.W., Knoll A.H., Narbonne G.M., Ross G., Goldberg T., Strauss H. Ferruginous conditions dominated later Neoproterozoic deep-water chemistry // *Science.* — 2008. — Vol. 321. — P. 949—952.

110. Carlson H.K., Clark I.C., Blazewicz S.J., Iavarone A.T., Coates J.D. Fe(II) oxidation is an innate capability of nitrate-reducing bacteria that involves abiotic and biotic reactions // *J. Bacteriol.* — 2013. — Vol. 195. — P. 3260-3268.
111. Catling D.C., Zahnle K.J. The Archean atmosphere // *Sci. Adv.* — 2020. — Vol. 266 - eaax1420.
112. Chakraborty A., Roden E.E., Schieber J., Picardal F. Enhanced growth of *Acidovorax* sp. strain 2AN during nitrate-dependent Fe(II) oxidation in batch and continuous-flow systems // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2011. — Vol. 77. — P. 548—8556.
113. Chaudhuri S.K., Lack J.G., Coates J.D. Biogenic magnetite formation through anaerobic biooxidation of Fe(II) // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2001. — Vol. 67. — P. 2844-2848.
114. Chistyakova N., Rusakov V., Zavarzina D., Slobodkin A., Gorohova T.V. Mössbauer study of magnetite formation by iron-and sulfate-reducing bacteria // *Hyperfine Interactions.* — 2004. — Vol. 156. — P. 411-415.
115. Chun J., Lee J.-H., Jung Y., Kim M., Kim S., Kim B.K., Lim Y.W. EzTaxon: a webbased tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2007. — Vol. 57. — P. 2259–2261.
116. Cipollone R., Ascenzi P., Visca P. Common themes and variations in the rhodanese superfamily // *IUBMB Life.* — 2007. — Vol. 59. — P. 51-59.
117. Cloud P. Significance of the Gunflint (Precambrian) microflora // *Science.* — 1965. — Vol. 148. — P. 27-35.
118. Coleman M.L., Hedrick D.B., Lovley D.R., White D.C., Pye K. Reduction of Fe(III) in sediments by sulfate-reducing bacteria // *Nature (Letters).* — 1993. — Vol. 361. — P. 436-438.
119. Cooper A.H., Brown T.J., Price S.J., Ford J. R., Waters C. N. Humans are the most significant global geomorphological driving force of the 21st century // *The Anthropocene Review.* — 2018. - Vol. 5 — P. 222-229.
120. Cormack A. N. A perfect lattice approach to nonstoichiometry // *Solid State Ionics.* — 1983. — Vol. 8. — P. 187-192.
121. Cornell R. M., Schwertmann U. *The Iron Oxides* // Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA. — 2004. — DOI: 10.1002/3527602097.
122. Coursolle D., Gralnick J.A. Modularity of the Mtr respiratory pathway of *Shewanella oneidensis* strain MR-1 // *Mol. Microbiol.* — 2010. — Vol. 77. — P. 995-1008.
123. Croal L.R., Jiao Y.Q., Newman D.K. The fox operon from *Rhodobacter* strain SW2 promotes phototrophic Fe(II) oxidation in *Rhodobacter capsulatus* SB1003 // *J. Bacteriol.* — 2007. — Vol. 189. — P. 1774-1782.

124. Croal L.R., Jiao Y., Kappler A., Newman D.K. Phototrophic Fe(II) oxidation in the presence of H₂: implications for banded iron formations // *Geobiology* — 2009. — Vol. 7. — P. 21-24.
125. Croal L.R., Johnson C.M., Beard B.L., Newman, D.K. Iron isotope fractionation by Fe(II)-oxidizing photoautotrophic bacteria // *Geochim. Cosmochim. Acta.* — 2004. — Vol. 68. — P. 1227-1242.
126. Cudennec Y., Lecerf A. The Transformation of ferrihydrite into goethite or hematite, revisited // *J. Solid State Chem.* — 2006. — Vol. 179. — P. 716-722.
127. Cui W., Liu G., Zeng C., Lu Y., Luo H., Zhang R. Improved hydrogen production in the single-chamber microbial electrolysis cell with inhibition of methanogenesis under alkaline conditions // *RSC Advances.* — 2019. — Vol. 9. — P. 30207-30215.
128. Da Costa G.M., De Grave E., Vandenberghe R.E. Mössbauer studies of magnetite and Al-substituted maghemites // *Hyperfine Interactions.* — 1998. — Vol. 117. — P. 207-243.
129. Das S, Hendry MJ, Essilfie-Dughan J. Transformation of two-line ferrihydrite to goethite and hematite as a function of pH and temperature // *Environ. Sci. Technol.* — 2011. — Vol. 45. — P. 268-275.
130. Deng T, Qian Y, Chen X, Yang X, Guo J, Sun G, Xu M. *Ciceribacter ferrooxidans* sp. nov., a nitrate-reducing Fe(II)-oxidizing bacterium isolated from ferrous ion-rich sediment // *J. Microbiol.* — 2020. — Vol. 58. — P. 350-356.
131. Deocampo D., Renaut R. Geochemistry of African soda lakes. / In: Schagerl, M. (eds) *Soda Lakes of East Africa* // Springer, Cham. — 2016. — DOI 10.1007/978-3-319-28622-8_4.
132. Dhakal P., Matocha, C.J., Huggins, F.E., Vandiviere M.M. Nitrite reactivity with magnetite // *Environ Sci Technol.* — 2013. — Vol. 47. — P. 6206-6213.
133. Ding L.J., Su J.Q., Xu H.J., Jia Z.J., Zhu Y.G. Long-term nitrogen fertilization of paddy soil shifts iron-reducing microbial community revealed by RNA-¹³C-acetate probing coupled with pyrosequencing // *ISME J.* — 2015. — Vol. 9. — P. 721-734.
134. Dinh H.T., Kuever J., Mussmann M., Hassel A.W., Stratmann M., Widdel F. Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms // *Nature.* — 2004. — Vol. 427. — P. 829-832.
135. Dong H. Mineral-microbe interactions: A review // *Front. Earth Sciences China.* — 2010. — Vol. 4. — P. 127-147.
136. Dong H., Fredrickson. J., Kennedy D., Zachara J., Kukkadapu R., Onstott T. Mineral transformations associated with the microbial reduction of magnetite // *Chem. Geol.* — 2000. — Vol. 169. — P. 299-318.
137. Dong H., Jaisi D., Kim J., Zhang G. Microbe—clay mineral interactions // *American Mineralogist.* — 2009. — Vol. 94. — P. 1505-1519.

138. Dreher C.L., Schad M., Robbins L.J., Konhauser K.O., Kappler A., Joshi P. Microbial processes during deposition and diagenesis of Banded Iron Formations // *Palaontol. Z.* — 2021. — Vol. 95. — P. 593-610.
139. Drissi S.H., Refait P., Abdelmoula M., Genin J.-M.R. The preparation and thermodynamic properties of Fe(II)-Fe(III) hydroxide-carbonate (green rust 1) - Pourbaix diagram of iron in carbonate-containing aqueous-media // *Corrosion Science.* — 1995. — Vol. 37. — P. 2025-2041.
140. Duarte E.L., Itri R., Lima E. Jr., Baptista M.S., Berquo T.S. Large magnetic anisotropy in ferrihydrite nanoparticles synthesized from reverse micelles // *Nanotechnology.* — 2006. — Vol. 17. — P. 5549-5555.
141. Duckworth O., Holmstrom S., Pena J., Sposito G. Biogeochemistry of iron oxidation in a circumneutral freshwater habitat // *Chem. Geol.* — 2009. — Vol. 260. — P. 149-158.
142. Ehrenreich A., Widdel F. Anaerobic oxidation of ferrous iron by purple bacteria, a new type of phototrophic metabolism // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1994. — Vol. 60. — P. 4517-4526.
143. Eickhoff M., Birgel D., Talbot H. M., Peckmann J., Kappler A. Oxidation of Fe(II) leads to increased C-2 methylation of pentacyclic triterpenoids in the anoxygenic phototrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* strain TIE-1 // *Geobiology.* — 2013. — Vol. 11. — P. 268-278.
144. Eliyan F., Alfantazi A. Mechanisms of corrosion and electrochemical significance of metallurgy and environment with corrosion of iron and steel in bicarbonate and carbonate solutions — a review // *Corrosion-Houston Tx.* — 2014. — Vol. 70. — 10.5006/1213.
145. Emerson D. The role of iron-oxidizing bacteria in biocorrosion: a review // *Biofouling.* — 2018. — Vol. 34. — P. 989-1000.
146. Emerson D., Weiss J.V. Bacterial iron oxidation in circumneutral freshwater habitats: findings from the field and the laboratory // *Geomicrobiol. J.* — 2004. — Vol. 21. — P. 405-414.
147. Emerson D., Fleming E.J., McBeth J.M. Iron-oxidizing bacteria: an environmental and genomic perspective // *Annual. Rev. Microbiol.* — 2010. — Vol. 64. — P. 561-583.
148. Espitalié J., Bordenave M.L. Screening techniques for source rocks evaluation; tools for source rocks routine analysis. / In: *Rock-Eval pyrolysis in Applied Petroleum Geochemistry* (ed. Bordenave, M.L.) // Editions Technip, Paris, France. — 1993. — P. 273-261.
149. Esteve-Núñez A., Sosnik J., Visconti P., Lovley D.R. Fluorescent properties of c-type cytochromes reveal their potential role as an extracytoplasmic electron sink in *Geobacter sulfurreducens* // *Environ. Microbiol.* — 2008. — Vol. 10. — P. 497-505.
150. Esther J., Sukla L.B., Pradhan N., Panda S. Fe(III)-reduction strategies of dissimilatory iron reducing bacteria // *Korean J. Chem.* — 2015. — Vol. 32. — P. 1-14.

151. Etique M., Jorand F.P., Ruby C. Magnetite as a precursor for green rust through the hydrogenotrophic activity of the iron-reducing bacteria *Shewanella putrefaciens* // *Geobiology*. — 2016. — Vol. 14. — P. 237-254.
152. Eugster, H. P. Chapter 15. Lake Magadi, Kenya, and Its Precursors. In A. Nissenbaum (Ed.), *Developments in Sedimentology*. — 1980. -Vol. 28. — P. 195–232.
153. Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott, S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // *Microbiome*. — 2014. — Vol. 2. — P. 1-7.
154. Feng J., Jiang M., Li K., Lu Q, Xu S., Wang X., Chen K., Ouyang P. Direct electron uptake from a cathode using the inward Mtr pathway in *Escherichia coli* // *Bioelectrochem*. — 2020. — Vol. 134 - 107498.
155. Feng X.H., Liu F., Tan W.F., Liu X.W. Synthesis of birnessite from the oxidation of Mn^{2+} by O_2 in alkali medium: effects of synthesis conditions // *Clays Clay Miner*. — 2004. — Vol. 52. — P. 240-250.
156. Fleming E.J., Langdon A.E., Martinez-Garcia M., Stepanauskas R., Poulton N.J., Masland E.D., Emerson D. What's new is old: resolving the identity of *Leptothrix ochracea* using single cell genomics, pyrosequencing and FISH // *PLoS One*. — 2011. — Vol. 6(3). — e17769.
157. Flynn T.M., O'Loughlin E.J., Mishra B., DiChristina T.J., Kemner K.M. Sulfur-mediated electron shuttling during bacterial iron reduction // *Science*. — 2014. — Vol. 344. — P. 1039-1042.
158. Foti M., Sorokin D.Y., Lomans B., Mussman M., Zakharova E.E., Pimenov N.V., Kuenen J.G., Muyzer G. Diversity, activity and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes // *Appl. Environ. Microbiol*. — 2007. — Vol. 73. — P. 2093-2100.
159. Foti M., Sorokin D.Y., Zakharova E.E., Pimenov N.V., Kuenen J.G., Muyzer G. Bacterial diversity and activity along a salinity gradient in soda lakes of the Kulunda Steppe (Altai, Russia) // *Extremophiles*. — 2008. — Vol. 12. — P. 133-145.
160. Frankel R.B., Blakemore R.P., Wolfe R.S. Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria // *Science*. — 1979. — Vol. 203. — P. 1355-1356.
161. Fredrickson J.K., Zachara J.M., Kennedy D., Dong H., Onstott T., Hinman N., Li S. Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium // *Geochim. Cosm. Acta*. — 1998. — Vol. 62. — P. 3239-3257.
162. Friese A., Bauer K., Glombitza C., Ordoñez L., Ariztegui D., Heuer V. B., Vuillemin A., Henny C., Nomosatryo S., Simister R., Wagner D., Bijaksana S., Vogel H., Melles M., Russell J., Crowe S., Kallmeyer J. Organic matter mineralization in modern and ancient ferruginous sediments // *Nat. Commun*. — 2021. — Vol. 121- 2216.

163. Frigaard N.U., Bryant D.A. Genomic and evolutionary perspectives on sulfur metabolism in green sulfur bacteria. / In: Dahl, C., Friedrich, C.G. (eds) *Microbial Sulfur Metabolism* // Springer, Berlin, Heidelberg— 2008.— P. 60-76.
164. Fuchs G. Variations of the acetyl-CoA pathway in diversely related microorganisms that are not acetogens. / In: H. L. Drake (eds) *Acetogenesis* // New York: Chapman and Hall. – 1994. – P. 507-520.
165. Gauger T., Byrne J.M., Konhauser K.O., Obst M., Crowe, S.A., Kappler, A. Influence of organics and silica on Fe(II) oxidation rates and cell—mineral aggregate formation by the green-sulfur Fe(II)-oxidizing bacterium *Chlorobium ferrooxidans* KoFox—Implications for Fe(II) oxidation in ancient oceans // *Earth. Planet. Sci. Lett.* — 2016. — Vol. 443. — P. 81-89.
166. Gavrillov S., Zavarzina D., Elizarov I., Tikhonova T., Dergousova N., Popov V., Lloyd J., Knight D., El-Naggar M., Pirbadian S., Leung K.M., Robb F., Zakhartsev M., Bretschger, O., Bonch-Osmolovskaya E. Novel extracellular electron transfer channels in a Gram-positive thermophilic bacterium // *Front. Microbiol.* — 2021. —11. 597818.
167. Gazze S., Saccone L., Smits M., Duran A., Leake J., Banwart S., Ragnarsdottir K., McMaster T. Nanoscale observations of extracellular polymeric substances deposition on phyllosilicates by an ectomycorrhizal fungus // *Geomicrobiol. J.* — 2013. — Vol. 30. — P. 721-730.
168. Génin J.-M., Christy A., Kuzmann E., Mills S., Ruby C. Structure and occurrences of "green rust" related new minerals of the "fougérite" group, trébeurdenite and mössbauerite, belonging to the "hydrotalcite" supergroup // *Hyperfine Int.* — 2014. — Vol. 226. — P. 459-482.
169. Genin J.-M.R., Mills S.J., Christy A.G., Guerin O., Herbillon A.J., Kuzmann E., Ona-Nguema G., Ruby C., Upadhyay C. Mossbauerite, $\text{Fe}^{3+}_6\text{O}_4(\text{OH})_8[\text{CO}_3] \times 3\text{H}_2\text{O}$, the fully oxidized 'green rust' mineral from Mont Saint-Michel Bay France // *Mineralogical Magazine.* — 2014. — Vol. 78. — P. 447-465.
170. Ghiorse W.C. Biology of iron- and manganese-depositing bacteria // *Annu. Rev. Microbiol.* — 1984. — Vol. 38. — P. 515-550.
171. Gohl D., MacLean A., Hauge A., Becker A., Walek D., Beckman K. An optimized protocol for high-throughput amplicon-based microbiome profiling // *Protocol. Exchange.* — 2016. — DOI 10.1038/protex.2016.030.
172. Gorin D., Yashchenok A., Koksharov Y., Neveshkin A., Serdobintsev A., Khomutov G. Surface morphology and optical and magnetic properties of polyelectrolyte/magnetite nanoparticles nanofilms // *Tech. Phys.* — 2009. — Vol. 54. — P. 1675-1680.
173. Gorlenko V., Tsapin A., Namsaraev Z., Teal T., Tourova T., Engler D., Mielke R., Nealson K. *Anaerobranca californiensis* sp. nov., an anaerobic, alkalithermophilic, fermentative

- bacterium isolated from a hot spring on Mono Lake // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2004. — Vol. 54. — P. 739-743.
174. Gorski C.A. and Scherer M.M. Determination of nanoparticulate magnetite stoichiometry by Mossbauer spectroscopy, acidic dissolution, and powder X-ray diffraction: A critical review // *American Mineralogist.* — 2010. — Vol. 95. — P. 1017-1026.
175. Goswami P., He K., Li J., Pan Y., Roberts A.P., Lin W. Magnetotactic bacteria and magnetofossils: ecology, evolution and environmental implications // *npj Biofilms Microbiomes.* — 2022. — Vol. 8. - 43.
176. Goya G.F., Berquo T.S., Fonseca F.C., Morales M.P. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles // *J. Appl. Physics.* — 2003. — Vol. 94. — P. 3520-3528.
177. Grant F.S. Aeromagnetism, geology and ore environments, I. Magnetite in igneous, sedimentary and metamorphic rocks: an overview // *Geoexploration.* — 1985. — Vol. 23. — P. 303-333.
178. Grant W.D., Jones B.E. Bacteria, archaea and viruses of soda lakes. / In: Schagerl, M. (eds) *Soda Lakes of East Africa* // Springer, Cham. — 2016. — DOI 10.1007/978-3-319-28622-8_5
179. Grant W.D., Jones B.E., Mwatha W.E. Alkaliphiles: ecology, diversity and applications // *FEMS Microbiol Rev.* — 1990. — Vol. 75. — P. 255-270.
180. Greene A.C., Patel B.K., Yacob S. *Geoalkalibacter subterraneus* sp. nov., an anaerobic Fe(III)- and Mn(IV)-reducing bacterium from a petroleum reservoir, and emended descriptions of the family *Desulfuromonadaceae* and the genus *Geoalkalibacter* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2009. — Vol. 59. — P. 781-785.
181. Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A., Oren A. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2018. — Vol. 42. — P. 353-375.
182. Catling D., Guzman M.S., Rengasamy K., Stoica A., Singh R., Ranaivoarisoa T.O., Davenport E.J., Bai W., McGinley B., Meacham J.M., Bose A. Photoferrotrophy and phototrophic extracellular electron uptake is common in the marine anoxygenic phototroph *Rhodovulum sulfidophilum* // *ISME J.* — 2021. — Vol. 15. — P. 3384-3398.
183. Gupta D., Sutherland M.C., Rengasamy K., Meacham J.M., Kranz R.G., Bose A. Photoferrotrophs produce a PioAB electron conduit for extracellular electron uptake // *mBio.* — 2019. — Vol.10 — e02668-19.
184. Gupta R.S. (2013). Molecular markers for photosynthetic bacteria and insights into the origin and spread of photosynthesis. / In: J. Thomas Beatty (Ed.) *Advances in Botanical Research* // Cambridge, MA: Academic Press. 2013- Vol. 66 - P. 37—66.

185. Guzman M.S., Rengasamy K., Binkley M.M., Jones C., Ranaivoarisoa T.O., Singh R., Fike D.A., Meacham J.M., Bose A. Phototrophic extracellular electron uptake is linked to carbon dioxide fixation in the bacterium *Rhodopseudomonas palustris* // Nat. Commun. — 2019. — 10:1355.
186. Halevy I., Bachan A. The geologic history of seawater pH // Science. — 2017. — Vol. 355. — P. 1069-1071.
187. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 NT // Nucleic. Acids. Symp. — 1999. — Vol. 41. — P. 95-98.
188. Han S., Tang R., Yang S., Xie C.J., Narsing Rao M.P., Rensing C., Liu G.H., Zhou S.G. *Geothrix oryzisoli* sp. nov., a ferric iron-reducing bacterium isolated from paddy soil // Antonie Van Leeuwenhoek. — 2023. — Vol. 116. — P. 477-486.
189. Han X., Tomaszewski E., Sorwat J., Pan Y., Kappler A., Byrne J. Oxidation of green rust by anoxygenic phototrophic Fe(II)-oxidising bacteria // Geochem. Persp. Let. — 2020. — Vol. 12. — P. 52-57.
190. He S., Barco R.A., Emerson D., Roden E.E. Comparative genomic analysis of neutrophilic iron (II) oxidizer genomes for candidate genes in extracellular electron transfer // Front. Microbiol. — 2017. — 8:1584.
191. Hedderich R. Energy-Converting [NiFe] hydrogenases from Archaea and extremophiles: Ancestors of Complex I // J. Bioenerg. Biomembr. — 2004. — Vol. 36. — P. 65-75.
192. Hedrich S., Schlömann M., Johnson D. (2011). The iron-oxidizing Proteobacteria // Microbiology (Reading, England). -2011.- Vol. 157. - 1551-1564.
193. Hegler F., Posth N. R., Jiang J., Kappler A. Physiology of phototrophic iron (II)-oxidizing bacteria: implications for modern and ancient environments // FEMS. Microbiol. Ecol. — 2008. — Vol. 66. — P. 250-260.
194. Hein J.R., Koschinsky A. Deep-ocean ferromanganese crusts and nodules // Treatise on geochemistry. — 2014. — Vol. 13. — P. 273-291.
195. Hein J.R., Koschinsky A., Kuhn T. Deep-ocean polymetallic nodules as a resource for critical materials // Nat. Rev. Earth. Environ. — 2020. — Vol. 1. — P. 158-169.
196. Heising S., Schink B. Phototrophic oxidation of ferrous iron by a *Rhodomicrobium vannielii* strain // Microbiology. — 1998. — Vol. 144. — P. 2263-2269.
197. Heising S., Richter L., Ludwig W., Schink B. *Chlorobium ferrooxidans* sp. nov., a phototrophic green sulfur bacterium that oxidizes ferrous iron in co-culture with a “*Geospirillum*” sp. strain // Arch. Microbiol. — 1999. — Vol. 172. — P. 116-124.
198. Hem J.D., Cropper W.H. Survey of ferrous-ferric chemical equilibria and redox potentials. / In: Chemistry of iron in natural water // Washington, U.S. Govt. Print. Off. - 1962.

199. Hernandez M.E., Newman D.K. Extracellular electron transfer // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2001. — Vol. 58. — P. 1562-1571.
200. Herrera L.K., Videla H.A. Role of iron-reducing bacteria in corrosion and protection of carbon steel // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* — 2009. — Vol. 63. — P. 891-895.
201. Higuchi, Y., Yagi, T., Yasuoka, N. Unusual ligand structure in Ni—Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis // *Structure.* — 1997. — Vol. 5. — P. 1671-1680.
202. Hiemstra T. Surface and mineral structure of ferrihydrite // *Geochim. Cosmochim. Acta.* — 2013. — Vol. 105. — P. 316-325.
203. Hiemstra T., Van Riemsdijk W.H. A surface structural model for ferrihydrite I: Sites related to primary charge, molar mass, and mass density // *Geochim. Cosmochim. Acta.* — 2009. — Vol. 73. — P. 4423-4436.
204. Holland H.D. The oceans: a possible source of iron in ironformations // *Economic Geologist.* — 1973. — Vol. 68. — P. 1169-1172.
205. Holmes D.E., Bond D.R., Lovley D.R. Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe(III) and graphite electrodes // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2004. — Vol. 70. — P. 1234-1237.
206. Holmes D.E., Nevin K.P., Lovley D.R. Comparison of 16S rRNA, nifD, recA, gyrB, rpoB, and fusA genes within the family *Geobacteraceae* fam. nov // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2004. — Vol. 54. — P. 1591-1599.
207. Hong H., Kim S.J., Min U.G., Lee Y.J., Kim S.G., Jung M.Y., Seo Y.S., Rhee S.K. *Geosporobacter ferrireducens* sp. nov., an anaerobic iron-reducing bacterium isolated from an oil-contaminated site // *Antonie Van Leeuwenhoek.* — 2015. — Vol. 107. — P. 971-977.
208. Hoover R.B., Pikuta E.V., Bej A.K., Marsic D., Whitman W.B., Tang J., Krader P. *Spirochaeta americana* sp.nov., a new haloalkaliphilic, obligately anaerobic spirochete isolated from soda Mono Lake in California // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2003. — Vol. 53. — P. 815-821.
209. Hori T., Aoyagi T., Itoh H., Narihiro T., Oikawa A., Suzuki K., Ogata A., Friedrich M.W., Conrad R., Kamagata Y. Isolation of microorganisms involved in reduction of crystalline iron(III) oxides in natural environments // *Front. Microbiol.* — 2015. — 6:386.
210. Hori T., Muller A., Igarashi Y., Conrad R., Friedrich M.W. Identification of iron-reducing microorganisms in anoxic rice paddy soil by ¹³C-acetate probing // *ISME J.* — 2010. — Vol. 4. — P. 267—278.
211. Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L., Andersson A.F. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range

- PCR in microbial ecology studies // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2014. — Vol. 80. — P. 5116-5123.
212. Ilbert M., Bonnefoy V. Insight into the evolution of the iron oxidation pathways // *BBA-Bioenergetics.* — 2012. — Vol. 1827. — P. 161-175.
213. Inoue K., Qian X.L., Morgado L., Kim B.C., Mester T., Izallalen M., Salgueiro C.A., Lovley, D.R. Purification and characterization of OmcZ, an outer-surface, octaheme c-type cytochrome essential for optimal current production by *Geobacter sulfurreducens* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2010. — Vol. 76. — P. 3999-4007.
214. Jaisi D.P., Dong H.L., Liu C.X. Influence of biogenic Fe(II) on the extent of microbial reduction of Fe(III) in clay minerals nontronite, illite, and chlorite // *Geochim. Cosmochim. Acta.* — 2007. — Vol. 71. — P. 1145-1158.
215. Jaisi D.P., Eberl D.D. Dong H.L., Kim J. The formation of illite from nontronite by mesophilic and thermophilic bacterail reaction // *Clays and Clay Minerals.* — 2011. — Vol. 59. — P. 21-33.
216. Jambor J.L., Dutrizac J.E. Occurrence and constitution of natural and synthetic ferrihydrite, a widespread iron oxyhydroxide // *Chem. Rev.* — 1998. — Vol. 98. — P. 2549-2585.
217. Jamieson J., Prommer H., Kaksonen A.H., Sun J., Siade A.J., Yusov A., Bostick B. Identifying and quantifying the intermediate processes during nitrate-dependent Iron(II) oxidation // *Environ. Sci. Technol.* — 2018. — Vol. 52. — P. 5771-5781.
218. Jiang C.Z., Tosca N.J. Fe(II)-carbonate precipitation kinetics and the chemistry of anoxic ferruginous seawater // *Earth. Planet. Sci. Lett.* — 2019. — Vol. 506. — P. 231-242.
219. Jiang X.-D., Sun X.-M., Guan Y. Biogenic mineralization in the ferromanganese nodules and crusts from the South China Sea // *J. Asian. Earth. Sci.* — 2019. — Vol. 171. — P. 46-59.
220. Jiao Y., Kappler A., Croal L.R., Newman D.K. Isolation and characterization of a genetically tractable photoautotrophic Fe(II)-oxidizing bacterium *Rhodopseudomonas palustris* strain TIE-1 // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2005. — Vol. 71. — P. 4487-4496.
221. Jiao Y., Newman D.K. The pio operon is essential for phototrophic Fe(II) oxidation in *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1 // *J. Bacteriol.* — 2007. — Vol. 189. — P. 1765-1773.
222. Jin Q., Kirk M.F. pH as a Primary control in environmental microbiology: 2. kinetic perspective // *Front. Environ. Sci.* — 2018. — 6:101.
223. Jin Q., Kirk M.F. pH as a Primary Control in Environmental Microbiology: 1. Thermodynamic Perspective // *Front. Environ. Sci.* — 2018. — 6:21.
224. Johnson D.B., Hallberg K.B. Acid mine drainage remediation options: a review // *Sci. Total. Environ.* — 2005. — Vol. 338. — P. 3-14.

225. Johnson C.A., Murayama M., Küsel K., Hochella M.F. Polycrystallinity of green rust minerals and their synthetic analogs: Implications for particle formation and reactivity in complex systems // *American Mineralogist*. — 2015. — Vol. 100. — P. 2091-2105.
226. Jones B.E., Grant W.D., Duckworth A.W., Owenson G.G. Microbial diversity of soda lakes // *Extremophiles*. — 1998. — Vol. 2. — P. 191-200.
227. Jones B.F., Eugster, H.P., Rettig, S.L. Hydrochemistry of the Lake Magadi basin, Kenya // *Geochim. Cosmochim. Acta*. — 1977. — Vol. 41. — P. 53-72.
228. Jones D.H., Srivastava K.K.P. Many-state relaxation model for the Mossbauer spectra of superparamagnets // *Physical. Review. B*. — 1986. — Vol. 34. — P.7542.
229. Kampschreur M.J., Kleerebezem R., de Vet W., Van Loosdrecht, M.C.M. Reduced ironinduced nitric oxide and nitrous oxide emission // *Water. Res.* — 2011. — Vol. 45. — P. 5945-5952.
230. Kapple, A., Schin, B., Newman D. Fe(III) mineral formation and cell encrustation by the nitrate-dependent Fe(II)-oxidizer strain BoFeN1 // *Geobiology*. — 2005. — Vol. 3. — P. 235-245.
231. Kappler A., Newman D.K. Formation of Fe(III)-minerals by Fe(II)-oxidizing photoautotrophic bacteria // *Geochim. Cosmochim. Acta*. — 2004. — Vol. 68. — P. 1217-1226.
232. Kappler A., Benz M., Schink B., Brune A. Electron shuttling via humic acids in microbial iron (III) reduction in a freshwater sediment // *FEMS Microbiol. Ecol.* — 2004. — V. 47. — P. 85-92.
233. Kappler A., Bryce C., Mansor M., Lueder U., Byrne J.M., Swanner E.D. An evolving view on biogeochemical cycling of iron // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2021. — Vol. 19. — P. 360-374.
234. Kappler A., Pasquero C., Konhauser K. O., Newman D. K. Deposition of banded iron formations by anoxygenic phototrophic Fe(II)-oxidizing bacteria // *Geology*. — 2005. — Vol. 33. — P. 865-868.
235. Karpeta, W.P. Bedded cherts in the Rietgat Formation, Hartbeesfontein, South Africa: a late Archaean to early Proterozoic magadiitic alkaline playa lake deposit? // *South African J. Geol.* — 1989. — Vol. 92. — P. 29-36.
236. Kato S. Microbial extracellular electron transfer and its relevance to iron corrosion // *Microb. Biotechnol.* — 2016. — Vol. 9. — P. 141-148.
237. Kato S., Hashimoto K, Watanabe K. Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi)conductive iron-oxide minerals // *Environ. Microbiol.* — 2012. — Vol. 14. — P. 1646-1654.

238. Kato S., Hashimoto K., Watanabe K. Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2012. — Vol. 109. — P. 10042-10046.
239. Kato S., Nakamura R., Kai F., Watanabe K., Hashimoto K. Respiratory interactions of soil bacteria with (semi)conductive iron-oxide minerals // Environ. Microbiol. — 2012. — Vol. 12. — P. 3114—3123.
240. Kato S., Hashimoto K., Watanabe K. Iron-oxide minerals affect extracellular electron-transfer paths of *Geobacter* spp // Microbes Environ. — 2013. — Vol. 28. — P. 141-148.
241. Kato S., Yumoto I., Kamagata Y. Isolation of acetogenic bacteria that induce biocorrosion by utilizing metallic iron as the sole electron donor // Appl. Environ. Microbiol. — 2015. — Vol. 81. — P. 67-73.
242. Keller A., Schink B., Müller N. Alternative pathways of acetogenic ethanol and methanol degradation in the thermophilic anaerobe *Thermacetogenium phaeum* // Front. Microbiol. — 2019. — 10:423.
243. Kempe S., Degens E.T. An early soda ocean? // Chem. Geol. — 1985. — Vol. 53. — P. 95-108.
244. Kevbrin V., Boltyanskaya Y., Zhilina T., Kolganova T., Lavrentjeva E., Kuznetsov B. *Proteinivorax tanatarense* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, haloalkaliphilic, proteolytic bacterium isolated from a decaying algal bloom, and proposal of *Proteinivoraceae* fam. nov // Extremophiles. — 2013. — Vol. 17. — P. 747-756.
245. Kevbrin V.V., Lysenko A.M., Zhilina T.N. (1997). Physiology of the alkaliphilic methanogen Z-7936, a new strain of *Methanosalsus zhilinae* isolated from Lake Magadi // Microbiology — Vol. 66. — P. 315-320.
246. Kevbrin V.V., Zhilina T.N., Rainey F.A., Zavarzin G.A. *Tindallia magadii* gen. nov., sp. nov.: an alkaliphilic anaerobic ammonifier from soda lake deposits // Curr. Microbiol. — 1998. — Vol. 37. — P. 94-100.
247. Khomyakova M., Merkel A., Kopitsyn D., Slobodkin A. *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. — Vol. 45. - 126304.
248. Khomyakova M.A., Zavarzina D.G., Merkel A.Y., Klyukina A.A., Pikhtereva V.A., Gavrilov S.N., Slobodkin A.I. The first cultivated representatives of the actinobacterial lineage OPB41 isolated from subsurface environments constitute a novel order *Anaerosomatales* // Front. Microbiol. — 2022. — 13:1047580.
249. Kim O.S., Cho Y.J., Lee K., Yoon S.H., Kim M., Na H., Park S.C., Jeon Y.S., Lee J.H., Yi H., Won S., Chun J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database

- with phylotypes that represent uncultured species // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2012. — Vol. 62. — P. 716-721.
250. Kim J., Dong H.L., Seabaugh J., Newell S.W., Eberl D.D. Role of microbes in the smectite-to-illite reaction // *Science*. — 2004. — Vol. 303. — P. 830-832.
251. King F. Corrosion resistance of austenitic and duplex stainless steels in environments related to UK geological disposal. / In: Nuclear Decommissioning Authority UK // Quintessa Ltd.: Henley-on-Thames, UK. - 2009.
252. Klein C. Some Precambrian banded iron-formations (BIFs) from around the world: their age, geologic setting, mineralogy, metamorphism, geochemistry, and origin // *Am. Mineral.* — 2005. — Vol. 90. — P. 1473-1499.
253. Klein F. Magnetite in seafloor serpentinite—Some like it hot // *Geology*. — 2014. — Vol. 42. — P. 135-138.
254. Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies // *Nucleic. Acids. Res.* — 2013. —41.e1.- DOI: 10.1093/nar/gks808.
255. Klueglein N., Kappler A. Abiotic oxidation of Fe(II) by reactive nitrogen species in cultures of thenitrate-reducing Fe(II) oxidizer *Acidovorax* sp. BoFeN1—questioning the existence of enzymatic Fe(II) oxidation // *Geobiology*. — 2013. — Vol. 11. — P. 180-190.
256. Klueglein N., Zeitvogel F., Stierhof Y.-D., Floetenmeyer M., Konhauser K. O., Kappler A. Potential role of nitrite for abiotic Fe (II) oxidation and cell encrustation during nitrate reduction by denitrifying bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2014. — Vol. 80. — P. 1051-1061.
257. Köehler I., Konhauser K., Kappler A. Role of microorganisms in banded iron formations. / In: L. Barton, M. Mandl, A. Loy (Eds.) *Geomicrobiology: molecular and tnvironmental perspective* // Springer, Dordrecht. -2010. - P. 309—324.
258. Köhler I., Konhauser K.O., Papineau D., Bekker A., Kappler A. Biological carbon precursor to diagenetic siderite with spherical structures in iron formations // *Nat. Com.* — 2013. — Vol. 4. — P. 1-7.
259. Kompantseva E.I., Bryantseva I.A., Komova A.V., Namsaraev B.B. The structure of phototrophic communities of soda lakes of the southeastern Transbaikal Region // *Microbiology*. — 2007. — Vol. 7. — P. 211-219.
260. Kondo K., Okamoto A., Hashimoto K., Nakamura R. Sulfur-mediated electron shuttling sustains microbial long-distance extracellular electron transfer with the aid of metallic iron sulfides // *Langmuir*. — 2015. — Vol. 31. — P. 7427-7434.

261. Konhauser K.O., Amskold L., Lalonde S.V., Posth N.R., Kappler A., Anbar A. Decoupling photochemical Fe(II) oxidation from shallow-water deposition // *Earth. Plan. Science Let.* — 2007. — Vol. 258. — P. 87-100.
262. Konhauser K.O., Newman D.K., Kappler A. The potential significance of microbial Fe(III) reduction during deposition of Precambrian banded iron formations // *Geobiology.* — 2005. — Vol. 3. — P. 167-177.
263. Kostka J.E., Nealson K.H. Dissolution and reduction of magnetite by bacteria // *Environ. Sci. Technol.* — 1995. — Vol. 29. — P. 2535-2540.
264. Kostka J.E., Stucki J.W., Nealson K.H., Wu J. Reduction of structural Fe(III) in smectite by a pure culture of *Shewanella putrefaciens* strain MR-1 // *Clays Clay Miner.* — 1996. — Vol. 44. — P. 522-529.
265. Krapež B., Barley M.E., Pickard A.L. Hydrothermal and resedimented origins of the precursor sediments to banded iron formation: Sedimentological evidence from the Early palaeoproterozoic Brockman Supersequence of Western Australia // *Sedimentology.* — 2003. — Vol. 50. — P. 979-1011.
266. Krissansen-Totton J., Arney G.N., Catling D.C. Constraining the climate and ocean pH of the early Earth with a geological carbon cycle model // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2018. — Vol. 115. — P. 4105-4110.
267. Kukkadapu R.K., Zachara J.M., Fredrickson J.K., Mckinley J.P., Kennedy D.W., Smith, S.C., Dong H. Reductive biotransformation of Fe in shale—limestone saprolite containing Fe(III) oxides and Fe(II)/Fe(III) phyllosilicates // *Geochim. Cosmochim. Acta.* — 2006. — Vol. 70. — P. 3662-3676.
268. Kukkadapu R., Zachara J., Fredrickson J., Kennedy D., Dohnalkova A., McCready D. Ferrous hydroxy carbonate is a stable transformation product of biogenic magnetite // *American Mineralogist.* — 2005. — Vol. 90. — P. 510-515.
269. Kulichevskaya I.S., Suzina N.E., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damsté J.S., Dedysh S.N. *Paludibaculum fermentans* gen. nov., sp. nov., a facultative anaerobe capable of dissimilatory iron reduction from subdivision 3 of the *Acidobacteria* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2014. — Vol. 64. — P. 2857-2864.
270. Kulp T.R., Han S., Saltikov C.V., Lanoil B.D., Zargar K., Oremland R.S. Effects of imposed salinity gradients on dissimilatory arsenate reduction, sulfate reduction, and other microbial processes in sediments from two California soda lakes // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2007. — Vol. 73. — P. 5130-5137.
271. Kulp T.R., Hoelt S.E., Miller L.G., Saltikov C., Murphy J.N., Han S., Lanoil B. Oremland, R.S. Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in sediments of two hyper-saline, arsenic-rich

- soda lakes: Mono and Searles Lakes, California // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2006. — Vol. 72. — P. 6514-6526.
272. Kunapuli U., Jahn M.K., Lueders T., Geyer R., Heipieper H.J. Meckenstock R.U. *Desulfitobacterium aromaticivorans* sp. nov. and *Geobacter toluenoxydans* sp. nov., iron-reducing bacteria capable of anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2010. — Vol. 60. — P. 686-695.
273. Lambrecht N., Katsev S., Wittkop C., Hall S. J., Sheik C.S., Picard A., Fakhraee M., Swanner E.D. Biogeochemical and physical controls on methane fluxes from two ferruginous meromictic lakes // *Geobiology.* — 2020. — Vol. 18. — P. 54-69.
274. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing / In: E. Stackebrandt and M. Goodfellow (Eds.) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* // New York: Wiley. — 1991. — P. 115—175.
275. Laufer K., Røy H., Jørgensen B. Evidence for the existence of autotrophic nitrate-reducing Fe(II)-oxidizing bacteria in marine coastal sediment // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2016. — Vol. 82. — P. 6120-6131.
276. Legrand L., Abdelmoula M., Gehin A., Chausse A., Genin J.-M.R. Electrochemical formation of a new Fe(II)-Fe(III) hydroxy-carbonate green rust: Characterisation and morphology // *Electrochimica Acta.* — 2001. — Vol. 46. — P. 1815-1822.
277. Legrand L., Mazerolles L., Chaussé A. The oxidation of carbonate green rust into ferric phases: solid-state reaction or transformation via solution // *Geochim. Cosmochim. Acta.* — 2004. — Vol. 68. — P. 3497-3507.
278. Lerm S., Westphal A., Miethling-Graff R., Alawi M., Seibt A., Wolfgramm M., Würdemann H. Thermal effects on microbial composition and microbiologically induced corrosion and mineral precipitation affecting operation of a geothermal plant in a deep saline aquifer // *Extremophiles.* — 2013. — Vol. 17. — P. 311-327.
279. Li G, Zeng X, Liu X, Zhang X, Shao Z. *Wukongibacter baidiensis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium isolated from hydrothermal sulfides, and proposal for the reclassification of the closely related *Clostridium halophilum* and *Clostridium caminithermale* within *Maledivibacter* gen. nov. and *Paramaledivibacter* gen. nov., respectively // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2016. — Vol. 66. — P. 4355-4361.
280. Li W., Beard B.L., Johnson C.M. Biologically recycled continental iron is a major component in banded iron formations // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2015. — Vol. 112. — P. 8193-8198.
281. Li Y., Yang G., Yao S., Zhuang L. *Paradesulfitobacterium ferrireducens* gen. nov., sp. nov., a Fe(III)-reducing bacterium from petroleum-contaminated soil and reclassification of *Desulfitobacterium aromaticivorans* as *Paradesulfitobacterium aromaticivorans* comb. nov // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2021. — Vol. 71. — DOI: 10.1099/ijsem.0.005025.

282. Li Y.-L., Vali H., Yang J., Phelps T.J., Zhang C.L. Reduction of iron oxides enhanced by sulfate-reducing bacterium and biogenic H₂S // *Geomicrob. J.* — 2006. — Vol. 23. — P. 103-117.
283. Light S., Méheust R., Ferrell J., Cho J., Deng D., Agostoni M., Iavarone A., Banfield J., D'Orazio S., Portnoy D. Extracellular electron transfer powers flavinylated extracellular reductases in Gram-positive bacteria // *Proceed. Nat. Acad. Scien.* — 2019 - 116. 201915678.
284. Lin C.Y., Turchyn, A.V., Krylov A., Antler G. The microbially driven formation of siderite in salt marsh sediments // *Geobiology.* — 2020. — Vol. 18. — P. 207-224.
285. Lin T.J., El Sebae G., Jung J.H., Jung D.H., Park C.S., Holden J.F. *Pyrodictium delaneyi* sp. nov., a hyperthermophilic autotrophic archaeon that reduces Fe(III) oxide and nitrate // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2016. — Vol. 66. — P. 3372-3376.
286. Lindh M.V., Maillot B.M., Shulse C.N., Gooday A.J., Amon D.J., Smith C.R., Church M.J. From the surface to the deep-sea: Bacterial distributions across polymetallic nodule fields in the Clarion-Clipperton zone of the Pacific ocean // *Front. Microbiol.* — 2017. — 8:1696.
287. Liu D., Dong H., Wang H., Zhao L. Low-temperature feldspar and illite formation through bioreduction of Fe(III)-bearing smectite by an alkaliphilic bacterium // *Chemic. Geol.* — 2015. — Vol. 406. — P. 25-33.
288. Liu F. Rotaru A.E., Shrestha P.M., Malvankar N.S., Nevin K.P., Lovley D.R. Magnetite compensates for the lack of a pilin-associated c-type cytochrome in extracellular electron exchange // *Environ. Microbiol.* — 2015. — Vol. 17. — P. 648–655.
289. Liu J., Wang Z., Belchik S.M., Edwards M.J., Liu C., Kennedy, D.W., Merkle E.D., Lipton M.S., Butt J.N., Richardson D.J., Zachara J.M., Fredrickson J.K., Rosso K.M., Shi L. Identification and characterization of MtoA: a decaheme c-type cytochrome of the neutrophilic Fe(II)-oxidizing bacterium *Sideroxydans lithotrophicus* ES-1 // *Front. Microbiol.* — 2012. — 3: 37.
290. Liu L, Wang W, Wu S, Gao H. Recent advances in the siderophore biology of *Shewanella* // *Front Microbiol.* — 2022. — 13:823758.
291. Ljungdahl L.G., Wiegel J. Working with anaerobic bacteria. / In: A.L. Demain and N.A. Solomon (Eds.), *Manual of industrial microbiology and biotechnology.* American Society for Microbiology // Washington, D.C. —1986. — P. 84-96.
292. Losey N.A., Stevenson B.S., Busse H.J., Damsté J.S.S., Rijpstra W.I.C., Rudd S., Lawson P.A. *Thermoanaerobaculum aquaticum* gen. nov., sp. nov., the first cultivated member of acidobacteria subdivision 23, isolated from a hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2013. — Vol. 63. — P. 4149—4157.

293. Lovley D.R., Holmes D.E. Protein nanowires: the electrification of the microbial world and maybe our own // *J. Bacteriol.* — 2020. — Vol. 202. — e00331-00320.
294. Lovley D.R. Syntrophy goes electric: direct interspecies electron transfer // *Annu. Rev. Microbiol.* — 2017. — Vol. 71. — P. 643-664.
295. Lovley D. Dissimilatory Fe(III)- and Mn(IV)-reducing prokaryotes. / In: E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory et al. (Eds.). *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry* // Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. — 2013.- P. 287—308.
296. Lovley D.R., Holmes D.E., Nevin K.P. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction // *Adv. Microb. Physiol.* — 2004. — Vol. 49. — P. 219-286.
297. Lovley D.R., Phillips E.J.P. Competitive mechanisms for inhibition of sulfate reduction and methane production in the zone of ferric iron reduction in sediments // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1998. — Vol. 53. — P. 2636-2641.
298. Lovley D.R., Giovannoni S.J., White D.C., Champine J.E., Phillips E.J., Gorby Y.A., Goodwin S. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals // *Arch. Microbiol.* — 1993. — Vol. 159. — P. 336-344.
299. Lovley D.R., Chapelle F.H., Phillips E.J.P. Fe(III)-reducing bacteria in deeply buried sediments of the Atlantic coastal plain // *Geology.* — 1990. — Vol. 18. — P. 954-957.
300. Lovley D.R., Phillips E.J.P. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1988. — Vol. 54. — P. 1472-1480.
301. Lovley D.R. Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron: A Review // *Geomicrobiol. J.* — 1987. — Vol. 5. — P. 375-399.
302. Lovley D.R., Phillips E.J.P. Competitive mechanisms for inhibition of sulfate reduction and methane production in the zone of ferric iron reduction in sediments // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1987. — Vol. 53. — P. 2636-2641.
303. Lusk B. Thermophiles or, the modern prometheus: the importance of extreme microorganisms for understanding and applying Extracellular Electron Transfer // *Front. Microbiol.* — 2019. — 10:00818.
304. Malak Z.R., Gao A., Wishart J.F., Isied S.S. Long-range electron transfer across peptide bridges: The transition from electron superexchange to hopping // *J. Am. Chem. Soc.* — 2004. — Vol. 126. — P. 13888-13889.
305. Maliva R.G., Knoll A.H., Simonson B.M. Secular change in the Precambrian silica cycle: insights from chert petrology // *Geol. Soc. Amer. Bull.* — 2005. — Vol. 117. — P. 835-845.

306. Mallinger K., Mergili M. The global iron industry and the Anthropocene // *The Anthropocene Review*. — 2020. — Vol. 9. — P. 52-70.
307. Manske A.K., Glaeser J., Kuypers M.M., Overmann J. Physiology and phylogeny of green sulfur bacteria forming a monospecific phototrophic assemblage at a depth of 100 meters in the Black Sea // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2005. — Vol. 71. — P. 8049-8060.
308. Manzoor S., Schnüre A., Bongcam-Rudloff E., Müller B. Genome-guided analysis of *Clostridium ultunense* and comparative genomics reveal different strategies for acetate oxidation and energy conservation in syntrophic acetate-oxidising bacteria // *Genes (Basel)*. — 2018. — 9:225.
309. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms // *J. Mol. Biol.* — 1961. — Vol. 3. — P. 208-218.
310. Marmur J., Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature // *J. Mol. Biol.* — 1962. — Vol. 4. — P. 109-118.
311. Marsili E., Baron D., Shikhare I., Coursolle D., Gralnick J., Bond D. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer // *Proceed. Nat. Ac. Sci. USA*. — 2008. — Vol. 105. — P. 3968-3973.
312. Mathrani J.M., Boone D.R., Mah R.A., Fox G.E., Lau P.P. *Methanohalophilus zhilinae* sp. nov., an alkaliphilic, halophilic, methylotrophic methanogen // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 1988. — Vol. 38. — P. 139-142.
313. Matsnev M E., Rusakov V.S. SpectrRelax: an application for Mössbauer spectra modeling and fitting // *AIP. Conference. Proceedings*. — 2014. — Vol. 1489. — P. 178-185.
314. Melville S. and Craig L. Type IV pili in Gram-positive bacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2013. — Vol. 77. — P. 323-341.
315. Menzel P., Gudbergsdóttir S.R., Rike A.G., Lin L., Zhang Q., Contursi P., Moracci M., Kristjansson J.K., Bolduc B., Gavrilo S., Ravin N., Mardanov A., Bonch-Osmolovskaya E., Young M., Krogh A., Peng X. Comparative metagenomics of eight geographically remote terrestrial hot springs // *Microb. Ecol.* — 2015. — Vol. 70. — P. 411-424.
316. Merkel A.Y., Tarnovetskii I.Y., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities // *Microbiology*. — 2019. — Vol. 88. — P. 671-680.
317. Mesbah N.M., Abou-El-Ela S.H., Wiegel J. Novel and unexpected prokaryote diversity in water and sediments of the alkaline hypersaline lakes of the Wadi An Natrun, Egypt // *Microb. Ecol.* — 2007. — Vol. 54. — P. 598-617.
318. Mesbah N.M. and Wiegel J. The anaerobic halophilic alkalithermophiles. / In: *Life at extreme environment* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2008. — Vol. 1125. — P. 44-57.

319. Myers C.R., Nealson K.H. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor // *Science*. — 1988. — Vol. 240. — P. 1319—1321.
320. Michel F.M., Ehm L., Antao S.M., Lee P.L., Chupas P.J., Liu G., Strongin D.R. The structure of ferrihydrite, a nanocrystalline material // *Science*. — 2007. — Vol. 316. — P. 1726—1729.
321. Millero F.J., Yao W., Aicher J. The speciation of Fe(II) and Fe(III) in natural waters // *Marine Chemistry*. — 1995. — Vol. 50. — P. 21—39.
322. Miot J., Etique M. Formation and transformation of iron-bearing minerals by iron(II)-oxidizing and iron(III)-reducing bacteria. / In: D. Faivre (Ed.), *Iron Oxides*, // Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH and CoKGaA. — 2016. — P. 53—98.
323. Miot J., Benzerara K., Morin G., Bernard S., Beyssac O., Larquet E., Kappler A, Guyot F. Transformation of vivianite by anaerobic nitrate-reducing iron-oxidizing bacteria // *Geobiology*. — 2009. — Vol. 7. — P. 373-384.
324. Miyata S. Anion-exchange properties of hydrotalcite-like compounds // *Clays and Clay minerals*. — 1983. — Vol. 31. — P. 305-311.
325. Moore O., Xiu W., Guo H., Polya D., Dongen B., Lloyd J. The role of electron donors in arsenic-release by redox-transformation of iron oxide minerals — A review // *Chem. Geol.* — 2023. — 619. 121322.
326. Mori K, Tsurumaru H, Harayama S. Iron corrosion activity of anaerobic hydrogen-consuming microorganisms isolated from oil facilities // *J. Biosci. Bioeng.* — 2010. — Vol. 110. — P. 426-430.
327. Morris B.E., Henneberger R., Huber H., Moissl-Eichinger C. Microbial syntrophy: interaction for the common good // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2013. — Vol. 37. — P. 384-406.
328. Morris R.C. Genetic modelling for banded iron-formation of the Hamersley Group, Pilbara Craton, Western Australia // *Precambrian Research*. — 1993. — Vol. 60. — P. 243-286.
329. Muehe E.M., Gerhardt S., Schink B., Kappler A. Ecophysiology and the energetic benefit of mixotrophic Fe(II)-oxidation by various strains of nitrate-reducing bacteria // *FEMS Microbiol. Ecol.* — 2009. — Vol. 70. — P. 335—343.
330. Mulder E., van Veen W. Investigations on the *Sphaerotilus-Leptothrix* group // A. Van Leeuw. — 1963. — Vol. 29. — P. 121-153.
331. Murad E. (1998). *Mössbauer Mineral Handbook*. / J.G. Stevens, A. Khasanov, J.W. Miller, H. Pollak and Z. Li (Eds.) // Mössbauer Effect Data Center, Asheville, NC 28804-8511, USA. — 1998. - 527 pp.
332. Nealson K.H., Myers C.R. Microbial reduction of manganese and iron: new approaches to carbon cycling // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1992. — Vol. 58. — P. 439-443.

333. Nesse W.D. Introduction to mineralogy // New York: Oxford University Press. — 2000. — 238 pp.
334. Nixon S.L., Bonsall E., Cockell C.S. Limitations of microbial iron reduction under extreme conditions // FEMS Microbiol. Rev. — 2022. — Vol. 46. — fuac033.
335. Nordhoff M, Tominski C, Halama M, Byrne JM, Obst M, Kleindienst S, Behrens S, Kappler A. Insights into nitrate-reducing Fe(II) oxidation mechanisms through analysis of cell-mineral associations, cell encrustation, and mineralogy in the chemolithoautotrophic enrichment culture KS // Appl. Environ. Microbiol. — 2017. — Vol. 83. — e00752-17.
336. Ohenhen L.O., Feinberg J.M., Slater L.D., Ntarlagiannis D., Cozzarelli I.M., Rios-Sanchez M., Isaacson C., Stricker A., Atekwana E. Microbially induced anaerobic oxidation of magnetite to maghemite in a hydrocarbon-contaminated aquifer // J. Geoph. Res. Biogeosci. — 2022. — Vol. 127. — e2021JG006560.
337. O'Loughlin E.J., Larese-Casanova P., Scherer M., Cook R. Green rust formation from the bioreduction of γ -FeOOH (lepidocrocite): Comparison of several *Shewanella* species // Geomicrobiol. J. — 2007. — Vol. 24. — P. 211-230.
338. O'Loughlin E.J., Gorski C.A., Scherer M.M., Boyanov M.I., Kemner K.M. Effects of oxyanions, natural organic matter, and bacterial cell numbers on the bioreduction of lepidocrocite (γ -FeOOH) and the formation of secondary mineralization products // Environ. Sci. Technol. — 2010. — Vol. 44. — P. 4570-4576.
339. Oremland R.S., Boone D.R. *Methanolobus taylorii* sp. nov., a new methylotrophic, estuarine methanogen // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1994. — Vol. 44. — P. 573-575.
340. Oremland R.S., Miller L.G. (1993). Biogeochemistry of natural gases in three alkaline, permanently stratified (meromictic) lakes. / In: D. Howell (Ed.). The Future of Energy Gases // Washington, DC: USGS Professional Paper. — 1993. — Vol. 1570 — P. 453-470.
341. Oren A., Garrity G.M. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 70, part 11 of the IJSEM // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2021. — Vol. 71. — P. 46-45.
342. Pantke C., Obst M., Benzerara K., Morin G., Ona-Nguema G., Dippon U., Kappler A. Green rust formation during Fe(II) oxidation by the nitrate-reducing *Acidovorax* sp. strain BoFeN1 // Environ. Sci. Technol. — 2012. — Vol. 46. — P. 1439-1446.
343. Park S., Kim D.H., Lee J.H., Hur H.G. *Sphaerotilus natans* encrusted with nanoball-shaped Fe(III) oxide minerals formed by nitrate-reducing mixotrophic Fe(II) oxidation // FEMS Microbiol. Ecol. — 2014. — Vol. 90. — P. 68-77.
344. 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. Acid. Research.* — 2022. — Vol. 50. — P. 785-794.
345. Pecoits E., Gingras M.K., Barley M.E., Kappler A., Posth N.R., Konhauser K.O. Petrography and geochemistry of the Dales Gorge banded iron formation: Paragenetic sequence, source and implications for palaeo-ocean chemistry // *Precambrian Research.* — 2009. — Vol. 172. — P. 163-187.
346. Pecoraino G., D'Alessandro W., Inguaggiato S. The other side of the coin: geochemistry of alkaline lakes in volcanic areas. / In: D. Rouwet et al. (Eds.) *Volcanic lakes, Advances in volcanology*// Springer-Verlag, Berlin. -2015. - P. 219—237.
347. Peiffer S., Kappler A., Haderlein S.B. Schmidt C. Byrne J., Kleindienst S., Vogt C., Richnow H., Obst M., Angenent L., Bryce C., Mccammon C., Planer-Friedrich B. A biogeochemical—hydrological framework for the role of redox-active compounds in aquatic systems // *Nat. Geosci.* — 2021. — Vol. 14. — P. 264-272.
348. Pentrakova L. Su K., Pentrak M., Stucki J. A review of microbial redox interactions with structural Fe in clay minerals // *Clay Minerals.* — 2013. — Vol. 48. — P. 543- 560.
349. Pfennig N. Anveicherungskulturen für Rote und Grüne Schwefelbakterium // *Z. Bakteriolog. Hyg. I Abt.* — 1965. — Vol. 1. — P. 179-189.
350. Picardal F. Abiotic and microbial interactions during anaerobic transformations of Fe(II) and [Formula: see text] // *Front. Microbiol.* — 2012. — 3:112.
351. Piekarczyk P., Parlinski K., Oleś A.M. Mechanism of the Verwey transition in magnetite // *Phys. Rev. Lett.* — 2006. — Vol. 97. — 156402.
352. 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 // *Int. J. System. Evol. Microbiol.* — 2003. — Vol. 53. — P. 1327-1332.
353. Pirbadian S. Barchinger S.E., Leung K.M., Byun H.S., Jangir Y., Bouhenni R.A., Reed S.B., Romine M.F., Saffarini D.A., Shi L., Gorby Y.A., Golbeck J.H., El-Naggar M.Y. *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2014. — Vol. 111. — P. 12883–12888.
354. Poser A., Lohmayer R., Vogt C., Knoeller K., Planer-Friedrich B., Sorokin D., Richnow H.H., Finster K. Disproportionation of elemental sulfur by haloalkaliphilic bacteria from soda lakes // *Extremophiles.* — 2013. — Vol. 17. — P. 1003-1012.

355. Poser A., Vogt C., Knöller K., Sorokin D.Y., Finster K.W., Richnow H.-H. Sulfur and oxygen isotope fractionation during bacterial sulfur disproportionation under anaerobic haloalkaline conditions // *Geomicrobiol. J.* — 2016. — Vol. 33. — P. 934-941.
356. Posth N.R., Huelin S., Konhauser K.O., Kappler A. Size, density and composition of cell—mineral aggregates formed during anoxygenic phototrophic Fe(II) oxidation: impact on modern and ancient environments // *Geochim. Cosmochim. Acta.* — 2010. — Vol. 74. — P. 3476-3493.
357. Posth N., Konhauser K., Kappler A. (2011). Banded Iron Formations. / In: J. Reitner, V. Thiel, (Eds.) *Encyclopedia of Geobiology. Encyclopedia of Earth Sciences Series* // Springer. — 2011. — P. 92-103.
358. Poulain, A.J., Newman D.K. *Rhodobacter capsulatus* catalyzes light-dependent Fe(II) oxidation under anaerobic conditions as a potential detoxication mechanism // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2009. — Vol. 75. — P. 6639-6646.
359. Preiner M., Igarashi K., Muchowska K.B., Yu M., Varma S.J., Kleinermanns K., Nobu M.K., Kamagata Y., Tüysüz H., Moran J., Martin W.F. A hydrogen-dependent geochemical analogue of primordial carbon and energy metabolism // *Nat. Ecol. Evol.* — 2020. — Vol. 4. — P. 534-542.
360. Qu D., Ratering S., Schnell S. Microbial reduction of weakly crystalline iron (III) oxides and suppression of methanogenesis in paddy soil // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* — 2004. — Vol. 72. — P. 1172-1181.
361. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic. Acids. Res.* — 2013. — Vol. 41. — P. 590-596.
362. Raymond J., Zhaxybayeva O., Gogarten J.P., Blankenship R.E. Evolution of photosynthetic prokaryotes: a maximum likelihood mapping approach // *Philos. Trans. R. Soc. B.* — 2003. — Vol. 358. — P. 223-230.
363. Reardon E.J. Anaerobic corrosion of granular iron: Measurement and interpretation of hydrogen evolution rates // *Environ. Sci. Technol.* — 1995. — Vol. 29. — P. 2936-2945.
364. Reardon P.N., Mueller K.T. Structure of the type IVa major pilin from the electrically conductive bacterial nanowires of *Geobacter sulfurreducens* // *J. Biol. Chem.* — 2013. — Vol. 288. — P. 29260-29266.
365. Refait P., Abdelmoula M., Genin J.-M.R., Sabot R. Green rusts in electrochemical and microbially influenced corrosion of steel // *Comptes. Rendus. Geoscience.* — 2006. — Vol. 338. — P. 476-487.
366. Reguera G., McCarthy K.D., Mehta T., Nicoll J.S., Tuominen M.T., Lovley D.R. Extracellular electron transfer via microbial nanowires // *Nature.* — 2005. — Vol. 435. — P. 1098-1101.

367. Reyes C., Schneider D., Thürmer A., Kulkarni A., Lipka M., Szejtrensus S., Böttcher M., Daniel R., Friedrich M. Potentially Active Iron, Sulfur, and Sulfate Reducing Bacteria in Skagerrak and Bothnian Bay Sediments // *Geomicrobiol. J.* — 2017. — Vol. 34. — DOI 10.1080/01490451.2017.1281360.
368. Roden E. E. Geochemical and microbiological controls on dissimilatory iron reduction // *Comptes. Rendus. Geoscience.* — 2006. — Vol. 338. — P. 456-467.
369. Roden E.E., Wetzel R.G.G. Competition between Fe(III)-reducing and methanogenic bacteria for acetate in iron-rich freshwater sediments // *Microb. Ecol.* — 2003. — Vol. 45. — P. 252-258.
370. Roden E.E., Urrutia M.M. Influence of biogenic Fe(II) on bacterial crystalline Fe(III) oxide reduction // *Geomicrobiol. J.* — 2002. — Vol. 19. — P. 209—251.
371. Roden E. Microbiological Controls on Geochemical Kinetics 1: Fundamentals and Case Study on Microbial Fe(III) Oxide Reduction. / In: S. Brantley, J. Kubicki, A. White (Eds.) // *Kinetics of Water-Rock Interaction.* Springer, New York. — 2008. — P. 335-415.
372. Roh Y., Zhang C., Vali H., Lauf R., Zhou J., Phelps T. Biogeochemical and environmental factors in Fe biomineralization: magnetite and siderite formation // *Clays and Clay Minerals.* — 2003. — Vol. 51. — P. 83-95.
373. Rotaru A.-E., Shrestha P.M., Liu F., Shrestha M., Shrestha D., Embree M., Zengler K., Wardman C., Nevin K., Lovley D. A new model for electron flow during anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer to *Methanosaeta* for the reduction of carbon dioxide to methane // *Energy. Environ. Sci.* — 2014. — Vol. 7. — P. 408-415.
374. Ruby C., Upadhyay C., Gehin A., Ona-Nguema G., Genin J.M.R. In situ redox flexibility of Fe-II-III oxyhydroxycarbonate green rust and fougérite // *Environ. Sci. Technol.* — 2006. — Vol. 40. — P. 4696-4702.
375. Rusch B., Génin J.-M., Ruby C., Abdelmoula M., Bonville P. Ferrimagnetic properties in Fe II—III (oxy)hydroxycarbonate green rusts // *Solid State Sciences.* — 2008. — Vol. 10. — P. 40-49.
376. Ryzhmanova Y., Nepomnyashchaya Y., Abashina T., Ariskina E., Troshina O., Vainshtein M., Scherbakova V. New sulfate-reducing bacteria isolated from Buryatian alkaline brakish lakes: description of *Desulfonatronum buryatense* sp. nov // *Exprempophiles.* — 2013. — Vol. 17. — P. 851-859.
377. Sahrawat K.L. Terminal electron acceptors for controlling methane emissions from submerged rice soils // *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* — 2004. — Vol. 35. — P. 1401-1413.
378. Salas E.C., Berelson W.M., Hammond D.E., Kampf A.R., Nealson K.H. The impact of bacterial strain on the products of dissimilatory iron reduction // *Geochim. Cosmochim. Acta.* — 2010. — Vol. 74. — P. 574-583.

379. Salazar J.S., Perez L., Abril O., Phuoc L.T., Ihiawakrin D., Vazquez M, Greneche J.-M., Begin-Colin S., Pourroy G. Magnetic iron oxide nanoparticles in 10-40 nm range: composition in terms of magnetite/maghemite ration and effect on the magnetic properties // *Chem. Material.* — 2011. — Vol. 23. — P. 1379-1386.
380. Saraiva I.H., Newman D.K., Louro R.O. Functional characterization of the FoxE iron oxidoreductase from the photoferrotroph *Rhodobacter ferrooxidans* SW2 // *J. Biol. Chem.* — 2012. — Vol. 287. — P. 25541-25548.
381. Sargent F. The model [NiFe]-Hydrogenases of *Escherichia coli* // *Adv. Microb. Physiol.* — 2016. — Vol. 68. — P. 433-507.
382. Schad M., Byrne J.M., Arrigo L.K.T., Kretzschmar R., Konhauser K.O., Kappler A. Microbial Fe cycling in a simulated Precambrian ocean environment: Implications for secondary mineral (trans)formation and deposition during BIF genesis // *Geochim. Cosmochim. Acta.* — 2022. — Vol. 331. — P. 165-191.
383. Schaedler S., Burkhart C., Hegler F., Straub K., Miot J., Benzerara K., Kappler A. Formation of cell-iron-mineral aggregates by phototrophic and nitrate-reducing anaerobic Fe(II)-oxidizing bacteria // *Geomicrobiol J.* — 2009. — Vol. 26. — P. 96-103.
384. Schagerl M., Renaut R.W. Dipping into the soda lakes of East Africa. / In: M. Schagerl (Eds.). *Soda Lakes of East Africa* // Springer, Cham. – 2016. - DOI:10.1007/978-3-319-28622-8_1.
385. Schink B. Synergistic interactions in the microbial world // *Ant. V. Leeuw.* — 2002. — Vol. 81. — P. 257-261.
386. Schink B., Stams A.J.M. Syntrophism among prokaryotes // In: M. Dworkin, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.). *The Prokaryotes* // New York: Springer Verlag – 2002 – DOI:2.10.1007/0-387-30742-7_11.
387. Schippers A., Jorgensen B.B. Biogeochemistry of pyrite and iron sulfide oxidation in marine sediments // *Geochim. Cosmochim. Acta.* — 2002. — Vol. 66. — P. 85-92.
388. Scholten J.C.M., Joye S.B., Hollibaugh J.T., Murrell J.C. Molecular analysis of the sulfate reducing and archaeal community in a meromictic soda lake (Mono Lake, California) by targeting 16S rRNA, mcrA, apsA, and dsrAB genes // *Microb. Ecol.* — 2005. — Vol. 50. — P. 29-39.
389. Schwalb C., Chapman S.K., Reid G.A. The tetraheme cytochrome CymA is required for anaerobic respiration with dimethyl sulfoxide and nitrite in *Shewanella oneidensis* // *Biochemistry.* — 2003. — Vol. 42. — P. 9491-9497.
390. Sekiguchi Y., Muramatsu M., Imachi H., Narihiro T., Ohashi A., Harada H., Hanada S., Kamagata Y. *Thermodesulfovibrio aggregans* sp. nov. and *Thermodesulfovibrio thiophilus* sp. nov., anaerobic, thermophilic, sulfate-reducing bacteria isolated from thermophilic methanogenic

- sludge, and emended description of the genus *Thermodesulfovibrio* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2008. — Vol. 58. — P. 2541-2548.
391. Sel O., Radha A.V., Dideriksen K., Navrotsky, A. Amorphous iron (II) carbonate: Crystallization energetics and comparison to other carbonate minerals related to CO₂ sequestration // Geochim. Cosmochim. Acta. — 2012. — Vol. 87. — P. 61-68.
392. Shelobolina E.S., Vanpraagh C.G., Lovley D.R. Use of ferric and ferrous iron containing minerals for respiration by *Desulfitobacterium frappieri* // Geomicrobiol. J. — 2003. — Vol. 20. — P. 143-156.
393. Shelobolina E., Xu H., Konishi H., Kukkadapu R., Wu T., Blothe M., Roden E. Microbial lithotrophic oxidation of structural Fe(II) in biotite // App. Environ. Microbiol. — 2012. — Vol. 78. — P. 5746-5752.
394. Shi L., Fredrickson J.K., Zachara J.M. Genomic analyses of bacterial porin-cytochrome gene clusters // Front. Microbiol. — 2014. — 5. 657.
395. Shi L., Richardson D.J., Wang Z., Kerisit S.N., Rosso K.M., Zachara J.M., Fredrickson J.K. The roles of outer membrane cytochromes of *Shewanella* and *Geobacter* in extracellular electron transfer // Environ. Microbiol. Rep. — 2009. — Vol. 1. — P. 220-227.
396. Shi L., Squier T., Zachara J., Fredrickson J. Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multiheme cytochromes // Mol. Microbiol. — 2007. — Vol. 65. — P. 12-20.
397. Shi L., Rosso K.M., Zachara J.M., Fredrickson J.K. Mtr extracellular electron-transfer pathways in Fe(III)-reducing or Fe(II)-oxidizing bacteria: a genomic perspective // Biochem. Soc. Trans. — 2012. — Vol. 40. — P. 1261-1267.
398. Shiraishi F., Mitsunobu S., Suzuki K., Hoshino T., Morono Y., Inagaki F. Dense microbial community on a ferromanganese nodule from the ultra-oligotrophic South Pacific Gyre: Implications for biogeochemical cycles // Earth. Planet. Sci. Lett. — 2016. — Vol. 447. — P. 10-20.
399. Shulga N., Abramov S., Klyukina A., Ryazantsev K., Gavrilov S. Fast-growing Arctic Fe-Mn deposits from the Kara Sea as the refuges for cosmopolitan marine microorganisms // Sci Rep. — 2022. — 20:21967.
400. Shulze C.N., Maillot B., Smith C.R., Church M.J. Polymetallic nodules, sediments, and deep waters in the equatorial North Pacific exhibit highly diverse and distinct bacterial, archaeal, and microeukaryotic communities // Microbiology open. — 2017. — Vol. 6. — e00428.
401. Shvarov Yu. A suite of programs, OptimA, OptimB, OptimC and OptimS compatible with the Unitherm database, for deriving the thermodynamic properties of aqueous species from

- solubility, potentiometry and spectroscopy measurements // *Appl. Geochem.* — 2015. — Vol. 55. — P. 17-27.
402. Shvarov, Y.V. HCh: New potentialities for the thermodynamic simulation of geochemical systems offered by windows // *Geochemistry. Int.* — 2008. — Vol. 46. — P. 834-839.
403. Simon L., Francois M., Refait P., Renaudin G., Lelaurain M., Genin J.-M.R. Structure of the Fe(II-III) layered double hydroxysulphate green rust two from Rietveld analysis // *Solid State Sci.* — 2003. — Vol. 5. — P. 327-334.
404. Simonson B.M. Origin and evolution of large Precambrian iron formations // *Spec. Pap. Geol. Soc. Am.* — 2003. — Vol. 370. — P. 231—244.
405. Slobodkin A., Sokolova T., Lysenko A., Wiegel J. Reclassification of *Thermoterrabacterium ferrireducens* as *Carboxydothemus ferrireducens* comb. nov., and emended description of the genus *Carboxydothemus* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2006. — Vol. 56. — P. 2349-2351.
406. 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. — Vol. 62. — P. 2565-2571.
407. Soares R., Costa N.L., Paquete C.M., Andreini C., Louro R.O. A new paradigm of multiheme cytochrome evolution by grafting and pruning protein modules // *Mol. Biol. Evol.* — 2022. — Vol. 39. — DOI: 10.1093/MOLBEV/MSAC139.
408. Sorokin D.Y., Merkel A.Y. *Dethiobacteria* class nov. / In: W. B. Whitman (Ed.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* // John Wiley and Sons. — 2022. — DOI 10.1002/9781118960608.cbm00089.
409. Sorokin D.Y., Merkel A.Y. (2019). *Dethiobacter*. / In: W. B. Whitman (Ed.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.* // John Wiley and Sons. — 2022. — DOI: 10.1002/9781118960608.GBM01696.
410. Sorokin D.Y., Abbas B., Geleijnse M., Kolganova T.V., Kleerebezem R., van Loosdrecht M.C. Syntrophic associations from hypersaline soda lakes converting organic acids and alcohols to methane at extremely haloalkaline conditions // *Environ. Microbiol.* — 2016. — Vol. 18. — P. 3189—3202.
411. Sorokin D., Banciu H., Muyzer G. Functional microbiology of soda lakes // *Current. Microbiol.* — 2015a. — Vol. 25. — P. 88-96.
412. Sorokin D.Y., Abbas B., Merkel A.Y., Rijpstra W.I., Damste J.S., Sukhacheva M.V., van Loosdrecht M.C. *Methanosalsum natronophilum* sp. nov., and *Methanocalculus alkaliphilus* sp. nov., haloalkaliphilic methanogens from hypersaline soda lakes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2015b. — Vol. 65. — P. 3739-3745.

413. Sorokin D.Y., Berben T., Melton E.D., Overmars L., Vavourakis C., Muyzer G. Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes // *Extremophiles*. — 2014a. — Vol. 18. — P. 791-809.
414. Sorokin D.Y., Abbas B., Tourova T.P., Bumazhkin B.K., Kolganova T.V., Muyzer G. Sulfate-dependent acetate oxidation at extremely natron-alkaline conditions by syntrophic associations from hypersaline soda lakes // *Microbiology*. — 2014b. — Vol. 160. — P. 723-732.
415. Sorokin D.Yu., Tourova T.P., Sukhacheva M.V., Muyzer G. *Desulfuribacillus alkaliarsenatis* gen. nov. sp. nov., a deep-lineage, obligately anaerobic, dissimilatory sulfur and arsenate-reducing, haloalkaliphilic representative of the order *Bacillales* from soda lakes // *Extremophiles*. — 2012. — Vol. 16. — P. 597-605.
416. Sorokin D.Y., Kuenen J.G., Muyzer G. The microbial sulfur cycle in soda lakes // *Front. Microbial Physiol.* — 2011. — 2:44.
417. Sorokin D. Y., Muyzer, G. Haloalkaliphilic spore-forming sulfidogens from soda lake sediments and description of *Desulfitispora alkaliphila* gen. nov., sp. nov // *Extremophiles*. — 2010a. — Vol. 14. — P. 313-320.
418. Sorokin D.Yu., Muyzer G. *Desulfurispira natronophila* gen. nov. sp. nov.: an obligately anaerobic dissimilatory sulfur-reducing bacterium from soda lakes // *Extremophiles*. — 2010b. — Vol. 14. — P. 349-355.
419. Sorokin D.Y., Rusanov I.I., Pimenov N.V., Tourova T.P., Abbas B., Muyzer G. Sulfidogenesis at extremely haloalkaline conditions in soda lakes of Kulunda Steppe (Altai, Russia) // *FEMS Microbiol. Ecol.* — 2010c. — Vol. 73. — P. 278-290.
420. Sorokin D.Y., Tourova T.P., Henstra A.M., Stams A.J.M., Galinski E.A., Muyzer G. Sulfidogenesis at extremely haloalkaline conditions by *Desulfonatronospira thiodismutans* gen. nov., sp. nov., and *Desulfonatronospira delicata* sp. nov. — a novel lineage of *Deltaproteobacteria* from hypersaline soda lakes // *Microbiology*. — 2008a. — Vol. 154. — P. 1444—1453.
421. Sorokin D.Yu., Tourova T.P., Mußmann 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*. — 2008b. — V. 12. — P. 431-439.
422. Sorokin D.Y., 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. — Vol. 11. — P. 363-370.
423. Sorokin D.Y., Gorlenko V.M., Namsaraev B.B., Namsaraev Z.B., Lysenko A.M., Eshinimaev B.T., Khmelenina V.N., Trotsenko Y.A., Kuenen J.G. Prokaryotic communities of the north-eastern Mongolian soda lakes // *Hydrobiologia*. — 2004. — Vol. 522. — P. 235-248.

424. Spurr A.R. A low—viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy // J. Ultrastruct. Res. — 1969. — Vol. 26. — P. 31-43.
425. Stams A.J., de Bok F.A., Plugge C.M., van Eekert M.H., Dolfing J., Schraa G. Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities // Environ. Microbiol. — 2006. — Vol. 8. — P. 371-382.
426. Stams A.J., Plugge C.M., de Bok F.A., van Houten B.H., Lens P., Dijkman H., Weijma J. Metabolic interactions in methanogenic and sulfate—reducing bioreactors // Water. Sci. Technol. — 2005. — Vol. 52. — P. 13-20.
427. Stefani D., Guo C., Ornago L., Cabosart D., El Abbassi M., Sheves M., Cahen D., van der Zant H.S.J. Conformation—dependent charge transport through short peptides // Nanoscale. — 2021. — Vol. 13. — P. 3002-3009.
428. Stern N., Mejia J., He S., Yang Y., Ginder-Vogel M., Roden E.E. Dual role of humic substances as electron donor and shuttle for dissimilatory iron reduction // Environ. Sci. Technol. — 2018. — Vol. 52. — P. 5691-5699.
429. Stolz J.F., Basu P., Oremland R.S. Microbial arsenic metabolism: new twists on an old poison // Microbe. — 2010. — Vol. 5. — P. 53-59.
430. Stookey L.L. Ferrozine — a new spectrophotometric reagent for iron // Anal. Chem. — 1970. — Vol. 42. — P. 779-781.
431. Straub K.L., Benz M., Schink B. Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH // FEMS Microbiol. — 2001. — Vol. 34. — P. 181-186.
432. Straub K.L., Rainey F.A., Widdel F. *Rhodovulum iodosum* sp. nov. and *Rhodovulum robiginosum* sp. nov., two new marine phototrophic ferrous-iron-oxidizing purple bacteria // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1999. — Vol. 49. — P. 729-735.
433. Straub K.L., Benz M., Schink B., Widdel F. Anaerobic, nitrate—dependent microbial oxidation of ferrous iron // Appl. Environ. Microbiol. — 1996. — Vol. 62. — P. 1458-1460.
434. Summers Z.M., Fogarty H., Leang C., Franks A.E., Malvankar N.S., Lovley D.R. Direct exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic co—culture of anaerobic bacteria // Science. — 2010. — Vol. 330. — P. 1413-1415.
435. Surakasi V.P., Wani A.A., Shouche Y.S., Ranade D.R. Phylogenetic analysis of methanogenic enrichment cultures obtained from Lonar Lake in India: isolation of *Methanocalculus* sp. and *Methanoculleus* sp // Microb. Ecol. — 2007. — Vol. 54. — P. 697-704.
436. Switzer Blum 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. — Vol. 171. — P. 19-30.

437. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 // *Mol. Biol. Evol.* — 2007. — Vol. 24. — P. 1596-1599.
438. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. Evol.* — 2011. — Vol. 28. — P. 2731-2739.
439. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // *Mol. Biol. Evol.* — 2013. — Vol. 30. — P. 2725-2729.
440. Tang H—Y., Holmes D.E., Ueki T., Palacios P.A., Lovley D.R. Iron corrosion via direct metal—microbe electron transfer // *mBio.* — 2019. — Vol. 10. — e00303.
441. Tebo B. M., Obraztsova A.Y. Sulfate—reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors // *FEMS Microbiol. Lett.* — 1998. — Vol. 162. — P. 193-198.
442. Thamdrup B. Bacterial manganese and iron reduction in aquatic sediments // *Adv. Microb. Ecol.* — 2000. — Vol. 16. — P. 41-84.
443. Thelemann M., Bebermeier W., Hoelzmann P., Lehnhardt E. Bog iron ore as a resource for prehistoric iron production in Central Europe — A case study of the Widawa catchment area in eastern Silesia, Poland // *Catena.* — 2016. — Vol. 149. — DOI 10.1016/j.catena.2016.04.002.
444. Tindall B.J. Prokaryotic life in the alkaline, saline, athalassic environment // *Halophilic bacteria.* — 1988. — Vol. 1. — P. 31-67.
445. Tindall B.J., Rosselló-Móra R., Busse H.-J., Ludwig W.P., Kämpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2010. — Vol. 60. — P. 249-266.
446. Tominski C., Heyer H., Lösekann—Behrens T., Behrens S., and Kappler A. Growth and population dynamics of the anaerobic Fe(II)—oxidizing and nitrate—reducing enrichment culture KS // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2018. — Vol. 84. — P. 1-15.
447. Tran Thi Thuy T., Kannoorpatti K., Padovan A., Thennadil S. Effect of alkaline artificial seawater environment on the corrosion behaviour of duplex stainless steel 2205 // *Appl. Sci.* — 2020. — 10. 5043.
448. Trolard F., Bourrié G., Abdelmoula M., Refait P., Feder F. Fougérite, a new mineral of the pyroaurite—iowaite group: description and crystal structure // *Clays and Clay Minerals.* — 2007. — Vol. 55, P. 323-334.
449. Trolard F., Genin J.-M., Abdelmoula M., Bourrié G., Humbert B., Herbillion A. Identification of a green rust mineral in a reductomorphic soil by Mossbauer and Raman spectroscopies // *Geochim. Cosm. Acta.* — 1997. — Vol. 61. — P. 1107-1111.

450. Trüper H.G., Schlegel H.G. Sulfur metabolism in *Thiorhodaceae*. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii* // *Ant. V. Leeuwen.* — 1970. — Vol. 30. — P. 225-238.
451. Tsurkan V., Krug von Nidda H.-A., Deisenhofer J., Lunkenheimer P., Loidl A. On the complexity of spinels: Magnetic, electronic, and polar ground states // *Physics Reports.* — 2021. — Vol. 926. — P. 1—86.
452. USGS (United States Geological Survey) Mineral commodity summaries 2019. U.S Geological Surveys. Available at: http://prd-wret.s3-us-west-2.amazonaws.com/assets/palladium/production/atoms/files/mcs2019_all.pdf (accessed 23 July 2019).
453. Usman M., Byrne J.M., Chaudhary A., Orsetti S., Hanna K., Ruby C., Kappler A., Haderlein S.B. Magnetite and green rust: synthesis, properties, and environmental applications of mixed-valent iron minerals // *Chem. Rev.* — 2018. — Vol. 118. — P. 3251—3304.
454. Varma S.J., Muchowska K.B., Chatelain P., Moran J. Native iron reduces CO₂ to intermediates and end-products of the acetyl-CoA pathway // *Nat. Ecol. Evol.* — 2018. — Vol. 2. — P. 1019-1024.
455. Venkateswaran K., Moser D.P., Dollhopf M.E., Lies D.P., Saffarini D.A., MacGregor B.J., Ringelberg D.B., White D.C., Nishijima M., Sano H., Burghardt J., Stackebrandt E., Nealson K.H. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 1999. — Vol. 49. — P. 705-724.
456. Waite D.W., Chuvochina M., Pelikan C., Parks D.H., Yilmaz P., Wagner M., Loy A., Naganuma T., Nakai R., Whitman W.B., Hahn M.W., Kuever J., Hugenholtz P. Proposal to reclassify the proteobacterial classes *Deltaproteobacteria* and *Oligoflexia*, and the phylum *Thermodesulfobacteria* into four phyla reflecting major functional capabilities // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2020. — Vol. 70. — P. 5972-6016.
457. Wang X., Gan L., Wiens M., Schlossmacher U., Schröder H.C., Müller W.E. Distribution of microfossils within polymetallic nodules: Biogenic clusters within manganese layers // *Mar. Biotechnol.* — 2012. — Vol. 14. — P. 96-105.
458. Wang Z., Shi Z., Shi L., White G.F., Richardson D.J., Clarke T.A., Fredrickson J.K., Zachara J.M. Effects of soluble flavin on heterogeneous electron transfer between surface-exposed bacterial cytochromes and iron oxides // *Geochim. Cosmochim. Acta.* — 2015. — Vol. 163. — P. 299—310.
459. Weber K.A., Picardal F.W., Roden E.E. Microbially catalyzed nitrate-dependent oxidation of biogenic solid-phase Fe(II) compounds // *Environ. Sci. Technol.* — 2001. — Vol. 35. — P. 1644-1650.

460. Weber K., Achenbach L., Coates J. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2006. — Vol. 4. — P. 752-764.
461. Weiss M.C., Sousa F.L., Mrnjavac N., Neukirchen S., Roettger M., Nelson-Sathi S., Martin W.F. The physiology and habitat of the last universal common ancestor // *Nat. Microbiol.* — 2016. — 25. 16116.
462. Widdel F., Schnell S., Heising S., Camacho A., Assmus B., and Schink B. Ferrous iron oxidation by anoxygenic phototrophic bacteria // *Nature.* — 1993. — Vol. 362. — P. 834-836.
463. Winogradsky S. Über Eisenbakterien // *Bot. Zeitung.* — 1888. — Vol. 46. — P. 262- 270.
464. Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. Formation of methane by bacterial extracts // *J. Biol. Chem.* — 1963. — Vol. 238. — P. 2882-2886.
465. Wright J.P., Attfield J.P., Radaelli P.G. Charge ordered structure of magnetite Fe₃O₄ below the Verwey transition // *Physical. Rev. B.* — 2002. — Vol. 66. — P. 214-222.
466. Wu W., Swanner E.D., Hao L., Zeitvogel F., Obst M., Pan Y., Kappler A. Characterization of the physiology and cell—mineral interactions of the marine anoxygenic phototrophic Fe(II) oxidizer *Rhodovulum iodosum*—implications for Precambrian Fe(II) oxidation // *FEMS Microbiol Ecol.* — 2014. — Vol. 88. — P. 503-515.
467. Wu Y.H., Liao I., Wang, C., Ma W.-L., Meng F.-X., Wu M., Xu X.-W. A comparison of microbial communities in deep—sea polymetallic nodules and the surrounding sediments in the Pacific Ocean // *Deep. Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* — 2013. — Vol. 79. — P. 40-49.
468. Xiong J. Photosynthesis: what color was its origin? // *Genome Biol.* — 2006. — Vol. 7. — P. 245.
469. Xu Z., Masuda Y., Hayakawa C., Ushijima N., Kawano K., Shiratori Y., Senoo K., Itoh H. Description of three novel members in the family *Geobacteraceae*, *Oryzomonas japonicum* gen. nov., sp. nov., *Oryzomonas sagensis* sp. nov., and *Oryzomonas ruber* sp. nov // *Microorganisms.* — 2020. — 8. 634.
470. Yadav S., Sadhotra C., Patil S.A. The bi-directional extracellular electron transfer process aids iron cycling by *Geoalkalibacter halelectricus* in a highly saline-alkaline condition // *BioRxiv.* — 2023. — preprint DOI:10.1101/2023.04.12.536630.
471. Yadav S., Singh R., Sundharam S.S., Chaudhary S., Krishnamurthi S., Patil S.A. *Geoalkalibacter halelectricus* SAP—1 sp. nov. possessing extracellular electron transfer and mineral—reducing capabilities from a haloalkaline environment // *Environ. Microbiol.* — 2022. — Vol. 24. — P. 5066-5081.
472. 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 // Nat. Rev. Microbiol. — 2014. — Vol. 12. — P. 653-645.
473. Ye Q., Roh Y., Carroll S. L., Blair B., Zhou J., Zhang, C., Fields M.W. Alkaline anaerobic respiration: isolation and characterization of a novel alkaliphilic and metal—reducing bacterium // Appl. Environ. Microbiol. — 2004. — Vol. 70. — P. 5595-5602.
474. Yellishetty M., Mudd G., Mason L., Mohr S. H., Prior T.D., Giurcoet D. Iron resources and production: Technology, sustainability and future prospects // Cluster Research Report. — 2012. — Vol. 1.10. — P. 1—60.
475. Yoho R.A., Popat S.C., Rago L., Guisasola A., Torres C.I. Anode biofilms of *Geoalkalibacter ferrihydriticus* exhibit electrochemical signatures of multiple electron transport pathways // Langmuir. — 2015. — 31.12552-9.
476. Yoneda Y., Yoshida T., Kawaichi S., Daifuku T., Takabe K., Sako Y. *Carboxydotherrnus pertinax* sp. nov., a thermophilic, hydrogenogenic, Fe(III)—reducing, sulfur—reducing carboxydrotrophic bacterium from an acidic hot spring // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2012. — Vol. 62. — P. 1692-1697.
477. 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 and whole genome assemblies // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2017. — Vol. 67. — P. 1613-1617.
478. Yuan Q., Wang S., Wang X., Li N. Biosynthesis of vivianite from microbial extracellular electron transfer and environmental application // Sci. Total. Environ. — 2021. — 762.143076.
479. Zachara J.M., Fredrickson J.K., Li S.-M., Kennedy D.W., Smith S., Gassman, P.L. Bacterial reduction of crystalline Fe³⁺ oxides in single phase suspensions and subsurface materials // American Mineralogist. — 1998. — Vol. 83. — P. 1426-1443.
480. Zachara J.M., Kukkadapu R.K., Fredrickson J.K., Gorby Y.A., Smith S.C. Biomineralization of poorly crystalline Fe(III) oxides by dissimilatory metal reducing bacteria (DMRB) // Geomicrobiol. J. — 2002. — Vol. 19. — P. 179-207.
481. Zakharyuk A., Kozyreva L., Ariskina E., Troshina O., Kopitsyn D., Shcherbakova V. *Alkaliphilus namsaraevii* sp. nov., an alkaliphilic iron— and sulfur—reducing bacterium isolated from a steppe soda lake // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2017. — Vol. 67. — P. 1990-1995.
482. Zakharyuk A.G., Kopitsyn D.S., Suzina N.E., Shcherbakova V. *Pelosinus baikalensis* sp. nov., an iron—reducing bacterium isolated from a cold freshwater lake // Microbiology. — 2023. — Vol. 92. — P. 137-145.
483. Zavarzina D.G., Prokofeva M.I., Pikhtereva V.A., Klyukina A.A., Maslov A.A., Merkel A.Y., Gavrilov S.N. *Deferrivibrio essentukiensis* sp. nov., gen. nov., a representative of

- Deferrivibrionaceae* fam. nov., isolated from the subsurface aquifer of Caucasian Mineral Drinking Waters // *Microbiology*. — 2022. — Vol. 91. — P. 143-159.
484. Zavarzina D.G., Sokolova T.G., Tourova T.P., Chernyh N.A., Kostrikina N.A., Bonch—Osmolovskaya E.A. *Thermincola ferriacetica* sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic bacterium capable of dissimilatory Fe(III) reduction // *Extremophiles*. — 2007. — Vol. 11. — P.1-7.
485. Zavarzina D.G., Tourova T.P., Kolganova T.V., Boulygina E.S., Zhilina T.N. 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. — Vol. 78. — P. 723-731.
486. Zhang C., Phelps T., Vali H., Romanek C., Liu S. Formation of single—domain magnetite by a thermophilic bacterium // *American mineralogist*. — 1998. — Vol. 83. — P. 1409-1418.
487. Zhang X., Yang G., Yao S., Zhuang L. *Shewanella shenzhenensis* sp. nov., a novel Fe(III)—reducing bacterium with abundant possible cytochrome genes, isolated from mangrove sediment // *Ant. V. Leeuwen*. — 2022. — Vol. 115. — P. 1245-1252.
488. Zhang Y.Z., Fang M.X., Zhang W.W., Li T.T., Wu M., Zhu X.F. *Salimesophilobacter vulgaris* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium isolated from paper—mill wastewater // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2013. — Vol. 63. — P. 1317-1322.
489. Zhang Z., Xu Z., Masuda Y., Wang X., Ushijima N., Shiratori Y., Senoo K., Itoh H. *Geomesophilobacter sediminis* gen. nov., sp. nov., *Geomonas propionica* sp. nov. and *Geomonas anaerohicana* sp. nov., three novel members in the family Geobacteraceae isolated from river sediment and paddy soil // *Syst. Appl. Microbiol.* — 2021. — 44. 126233.
490. Zhao L., Dong H., Edelmann R. E., Zeng Q., Agrawal A. Coupling of Fe(II) oxidation in illite with nitrate reduction and its role in clay mineral transformation // *Geochim. Cosmochim. Acta*. — 2017. — Vol. 200. — P. 353-366.
491. Zhilina T.N., Zavarzin G.A., Rainey F.A., 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 // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 1996. — Vol. 46. — P. 305-312.
492. 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. — Vol. 37. — P. 177-185.

493. Zhilina T.N., Zavarzin G.A., Rainey F.A., Pikuta E.V., Osipov G.A., Kostrikina N.A. *Desulfonatrovibrio hydrogenovorans* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic sulfate—reducing bacterium // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1997. — Vol. 47. — P. 144-149.
494. 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*. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2015. — Vol. 65. — P. 2432-2440.
495. 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 // Int. J. System. Evol. Microbiol. — 2005. — Vol. 55. — P. 1001—1006.
496. 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 // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2012. — Vol. 62. — P. 1666-1673.
497. Zvereva E., Fedorova T., Kevbrin V., Zhilina T., Rabinovich M. Cellulase activity of a haloalkaliphilic anaerobic bacterium, strain Z-7026 // Extremophiles. — 2006. — Vol. 10. — P. 53-60.