

На правах рукописи

ЗАВАРЗИНА Дарья Георгиевна

**ТРАНСФОРМАЦИЯ МИНЕРАЛОВ ЖЕЛЕЗА
АНАЭРОБНЫМИ БАКТЕРИЯМИ СОДОВЫХ ОЗЕР**

Специальность 1.5.11 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук**

Москва – 2023

Работа выполнена в Институте микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)

Научный консультант: **Бонч-Осмоловская Елизавета Александровна,** доктор биологических наук, чл.-корр. РАН, руководитель отдела биологии экстремофильных микроорганизмов ИНМИ им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН

Официальные оппоненты: **Грабович Маргарита Юрьевна,** доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биохимии и физиологии клетки, медико-биологический факультет, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет»

Земская Тамара Ивановна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии углеводов, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения РАН

Савенко Виталий Савельевич, доктор геолого-минералогических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры гидрологии суши, Географический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ведущая организация: Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук - филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук

Защита состоится «09» ноября 2023 года в 14 ч на заседании диссертационного совета 24.1.233.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке ИНМИ РАН по адресу 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан «__» августа 2023 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Т.В. Хижняк

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Криптозой, составляющий $\frac{3}{4}$ геологической истории Земли, является важнейшим этапом становления биосферы, во время которого при участии преимущественно прокариот сформировались основные биогеохимические циклы (Заварзин, 2011). В это время на протяжении более 1.5 млрд лет 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 в основном кварцем и минералами двух- и трехвалентного железа – оксидами, карбонатами и силикатами (Klein, 2005; Bekker et al., 2010).

Парадоксально высокая (+2.4) средняя степень окисления железа в минералах железисто-кремнистых формаций (Klein, 2005), заставляет искать эффективный способ окисления двухвалентного железа - первичной формы для этих пород (Klein, 2005; Bekker et al., 2010), в условиях бескислородной атмосферы (Catling and Zahnle, 2020). В конце прошлого века микробиологами были описаны процессы хемосинтеза, протекающие в анаэробных условиях с использованием железа в качестве акцептора или донора электронов. На сегодняшний день диссимиляционные железоредукторы – прокариоты получающие энергию за счет восстановления трехвалентного железа, выявлены практически во всех экологических нишах и ответственны за образование восстановленных минералов железа – магнетита Fe_3O_4 , сидерита $FeCO_3$ и вивианита $Fe_3(PO_4)_2 \times 8H_2O$ (Lovely et al., 2004; Nixon et al., 2022;). Открытые в конце прошлого века процессы анаэробного фото- и нитрат-зависимого окисления железа (Widdel et al., 1993; Straub et al., 1996), позволили геологам рассматривать биогенный фактор как один из ведущих в формировании железистых кварцитов (Konhauser et al., 2005; Kappler et al., 2005).

Предполагается, что огромные количества железа, сконцентрированные в этих формациях, накопились в результате двух основных процессов - подводной вулканической деятельности и выветривания (Holland, 1973; Posth et al., 2011). 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 суше. Конечным результатом углекислотного выветривания - ведущего фактора преобразования магматических пород в осадочные на поверхности Земли, является образование содовых озер (Заварзин, 2007). Модель «содового океана» (Kemp and Degens, 1985), существовавшего, по мнению авторов, в архее как следствие более интенсивного выветривания основных пород при повышенных концентрациях CO_2 в атмосфере (Catling and Zahnle, 2020), получила дальнейшее развитие в гипотезе «содового континента» (Заварзин, 1993). Она предполагает существование в архее-протерозое обширных мелководных содовых водоемов, служивших центрами распространения наземной микробиоты. В этом случае в условиях доминирования биогеохимического цикла железа большую роль в деградации органического вещества должны были играть алкалофильные микроорганизмы, получающие энергию за счет окисления/восстановления железа. Однако, из-за доминирования сульфидогенов в илах современных содовых озер (Sorokin et al., 2011) эта группа алкалофильных микроорганизмов оставалась вне рамок систематических исследований.

Таким образом, в контексте вышеизложенных фундаментальных вопросов, связанных с протяженным этапом развития геосферы и биосферы Земли, 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 и были описаны еще в девятнадцатом веке (Ghiorise, 1984). Процесс диссимиляционного восстановления железа был открыт значительно позже – в конце 20-го века, когда было продемонстрировано восстановление ферригидрита с молекулярным водородом (Балашова и Заварзин, 1980) или органическими кислотами и спиртами (Lovley, Phillips, 1986) в качестве доноров электронов. *Shewanella oneidensis* (Myers and Nealson, 1988, Venkateswaran et al., 1999) и *Geobacter metallireducens* (Lovley et al., 1993) - первые диссимиляционные Fe- и Mn-восстанавливающие бактерии, выделенные в чистую культуру, стали модельными объектами для изучения биохимических механизмов железоредукции и ознаменовали этап интенсивного исследования этого процесса. К настоящему моменту описано более 150 таксонов железоредукторов, развивающихся преимущественно в условиях, характерных для зоны гипергенеза, хотя известны и экстремофилы, из которых наиболее изученной является группа термофильных железоредукторов (Lovley, 2013; Nixon et al., 2022). Процесс анаэробного окисления железа был продемонстрирован сначала для аноксигенных фототрофов, а затем для нитратредукторов (Widdel et al., 1993; Straub et al., 1996). Было показано, что и аноксигенные фототрофы, и нитратредукторы способны использовать закисное железо как в растворенном виде, так и входящим в состав карбонатов (сидерит), оксидов (магнетит) и сульфидов (пирротин FeS). Таким образом, на сегодняшний день микробиологи имеют довольно полное представление о биогеохимическом цикле железа в анаэробных условиях при нейтральных значениях pH, движущей силой которого являются группы диссимиляционных железоредукторов, аноксигенных фототрофов и нитратредукторов.

Высокая интенсивность процессов углекислотного выветривания в докембрии, обусловленная большим парциальным давлением углекислоты, отсутствием наземной растительности и рядом других факторов, способствовала образованию эпиконтинентальных содовых водоемов, в которых из-за отсутствия сульфатов был редуцирован биогеохимический цикл серы, а алкалофильные микроорганизмы, использующие в окислительно-восстановительных реакциях соединения железа, наоборот, получали преимущество, учитывая тот факт что выветриваемые породы того времени содержали огромное количество железа (Holland, 1973; Холодов и Бутузова, 2004).

К началу настоящих исследований сведения о возможности трансформации минералов железа в анаэробных условиях при $\text{pH} \geq 9.0$ были крайне ограничены. Среди бактерий, диссимиляционно восстанавливающих железо, был известен только один алкалофил - «*Alkaliphilus metalliredigens*» (Ye et al., 2004), использующий исключительно растворимые органические комплексы Fe(III) с лактатом и дрожжевым экстрактом. 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* (Kevbrin et al., 1998), а также термоалкалофильная бактерия *Anaerobranca californiensis* (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 растворимости (Ye et al., 2004). Таким образом, с целью восполнения существующих пробелов знаний, очевидной была

необходимость проведения комплексных исследований в направлении изучения трансформации минералов железа под воздействием анаэробных алкалофильных бактерий содовых озер.

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., *Isachenkonkia 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 ($Fe_{10}O_{14}(OH)_2$) 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 ($Fe^{2+}_4Fe^{3+}_2(OH)_{12}CO_3 \times 3H_2O$), 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 бактерией *Ectothiorodospira shaposhnikovii*.

Показано, что процесс анаэробного окисления сидерита в отсутствие 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 $\text{pH} \geq 9.0$. 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 *Geoalkalibacter 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 - CO_2 и Fe^{2+} , 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 железоокисляющих 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.

Апробация результатов

Материалы диссертации доложены и обсуждены на международных и российских конференциях и симпозиумах: 11th, 12th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-11, ISME-12) (Vienna, Austria, 2006; Cairns, Australia, 2008); XI Международная конференция “Мёссбауэровская спектроскопия и ее применение“ (Екатеринбург, Россия, 2009); 8th, 10th International Congress on Extremophiles (Ponta Delgada, Azores, 2010; Saint Petersburg, Russia, 2014); 21st Annual V.M. Goldschmidt Conference (Prague, Czech, 2011); 1-ый, 2-ый, 3-й Российский Микробиологический Конгресс (Пушино, Россия, 2017; Саранск, Россия, 2019; Псков, Россия, 2021); XXXVII Annual Meeting of the European Culture Collections' Organization, Conference Proceedings (Moscow, Russia, 2018); III Всероссийская конференция с международным участием «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний» (Улан-Удэ, Россия, 2023).

Публикации

Материалы диссертации содержатся в 42 печатных работах, в том числе 21 экспериментальная статья.

Личный вклад автора в работу

Диссертационная работа является результатом многолетних (2005-2023 гг.) самостоятельных исследований автора. Автором сформулированы цели работы, поставлены задачи исследования, проведены все экспериментальные работы, обобщены и проинтерпретированы полученные результаты, сделаны итоговые выводы. Автор участвовал в подготовке всех научных публикаций и многократно выступал с научными докладами по теме диссертации.

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.

Место проведения работы и благодарности

Работа была выполнена в Институте микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН в лабораториях реликтовых микробных сообществ (заведующий акад. РАН д.б.н. Г.А. Заварзин[†]) и метаболизма экстремофильных прокариот (заведующий к.б.н. И.В. Кубланов). Электронно-микроскопические исследования были выполнены в ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН Н.А. Кострикиной, на Геологическом факультете имени М.В. Ломоносова М.С. Черновым и в Институте физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН Т.В. Алексеевой. Определение нуклеотидных последовательностей

генов 16S рРНК проводились в Институте Биоинженерии им. К.Г. Скрябина ФИЦ Биотехнологии РАН Т.П. Туровой, Т.В. Колгановой, А.Н. Пантелеевой, Е.С. Булыгиной, Б.Б. Кузнецовым. Хемотаксономические исследования проводились Г.А. Осиповым. Полногеномное секвенирование и анализ геномов были выполнены в ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН А.Ю. Меркелем, А.А. Клюкиной, А.А. Переваловой, С.Н. Гавриловым, С.В. Тощаквым, И.В. Кублановым, Е.Н. Фроловым и в ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН А.В. Мардановым. Исследования твердых фаз методами Мёссбауэровской спектроскопии, рамановской спектроскопии, спектроскопии электронного магнитного резонанса проводились на Физическом факультете им. М.В. Ломоносова Н.И. Чистяковой, В.С. Русаковым, А.А. Шапкиным, А.В. Антоновой, М.А. Грачевой, Ю.А. Кокшаровым. Рентгеноструктурный анализ и термодинамические расчеты проводились на Геологическом факультете им. М.В. Ломоносова А.Ю. Бычковым. Соискатель выражает глубокую благодарность всем упомянутым участникам и соавторам данной работы.

Соискатель выражает глубокую признательность своим учителям и наставникам Г.А. Заварзину, Т.Н. Жилиной, Е.А. Бонч-Осмоловской, А.И. Слободкину, М.Л. Мирошниченко, а также всем сотрудникам лабораторий реликтовых микробных сообществ и метаболизма экстремофильных прокариот за плодотворные дискуссии и всестороннюю помощь в выполнении работы. Отдельную и особенную признательность соискатель выражает своей семье за терпение и деятельную поддержку, проявленную на всех этапах работы.

Защищаемые положения

1. Алкалофильные анаэробные микроорганизмы, выделенные из содовых озер с различной минерализацией и $pH \geq 9.0$, 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 сбразивания 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 отсутствие 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во *введении* обоснована актуальность проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, отражена научная новизна и значимость полученных результатов, приведены защищаемые положения и сведения об апробации работы.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В главе изложены литературные данные о геохимии и гидрохимии железа, минералах, используемых в работе, а также о месторождениях железа, в формировании которых рассматривается участие микроорганизмов. Приведены данные об основных группах микроорганизмов, осуществляющих трансформацию железа в анаэробных условиях, минералах, образующихся в процессе их роста, а также стратегиях, используемыми бактериями для взаимодействия с минералами. Также изложены сведения об условиях формирования и типах содовых озёр и алкалофильных микробных сообществах, осуществляющих деградацию органического вещества в анаэробных донных осадках. В заключении приводятся данные об алкалофильных микроорганизмах, использующих соединения железа и известных на момент начала исследования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В главе изложены материалы и методы, использованные в процессе выполнения экспериментальных работ.

Образцы осадков и воды из содовых озёр были отобраны 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.

Образцы природных минералов были предоставлены д.г.-м.н. А.Ю. Бычковым, д.г.-м.н. В.С. Савенко и д.г.-м.н. Т.В. Алексеевой. Чистоту минералов проверяли методами рентгеноструктурного анализа и Мёссбауэровской спектроскопии.

Для получения и культивирования накопительных и чистых культур бактерий были использованы среды, приготовленные с использованием техники анаэробного культивирования, соответствующие по катионно-анионному составу водам исследованных содовых озёр, из которых был исключен сульфат. Помимо природных минералов, в экспериментах использовали синтезированные фазы: ферригидрит (СФ), полученный путём титрования раствора $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 10% раствором NaOH до pH 8.0-9.0 и магнетит (СМ), полученный 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.

Описание новых таксонов микроорганизмов осуществляли в соответствии с правилами, предъявляемыми Международным комитетом по систематике прокариот к описанию новых таксонов микроорганизмов.

Количество клеток определяли прямым подсчётом с помощью световой и флуорисцентной микроскопии, а также количественной ПЦР (кПЦР). Потребление субстратов и образование метаболитов определяли хроматографически и колориметрически. Применённые в работе электронно-микроскопические и молекулярно-биологические методы описаны в полном тексте диссертации и соответствующих публикациях.

Для объективной оценки производимых микроорганизмами трансформаций используемых в экспериментах минералов использовали комплекс методов, включающих методы Мёссбауэровской спектроскопии, порошковой рентгеновской дифракции, рамановской спектроскопии, спектроскопии электронного магнитного резонанса, описание которых приведено в полном тексте диссертации и

соответствующих публикациях.

Термодинамические расчеты проводили с использованием программы HCh (Shvarov, 2008, 2015) и базы данных Unitherm (Shvarov, 2015).

ГЛАВА 3. АЛКАЛОФИЛЬНЫЕ ЖЕЛЕЗОРЕДУЦИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ

Оценка распространенности процесса диссимиляционной железоредукции в содовых озерах была проведена с использованием проб донных осадков содовых озер Алтая, Тувы и Восточной Африки. Молекулярный водород или ацетат добавляли в качестве донора и СФ в качестве акцептора электронов. Результаты исследований позволили сделать вывод, что процесс диссимиляционной железоредукции широко распространен в содовых озерах, поскольку он был обнаружен во всех без исключения пробах. Численность железоредукторов составляла 10^5 - 10^6 кл/мл. Во всех пробах восстановление СФ с молекулярным водородом шло интенсивнее, чем с ацетатом.

3.1. Новые литоавтотрофные алкалофильные железоредукторы

Полученные на этапе оценки распространенности железоредукции в содовых озерах накопительные культуры были использованы для выделения чистых культур диссимиляционных железоредукторов. Выделенные первые литоавтотрофные алкалофильные железоредукторы филогенетически оказались удалены друг от друга, но физиологически имели много общих черт (Табл. 1, Рис. 1). Все они являлись мезофилами и истинными алкалофилами с оптимумом роста при значениях $\text{pH} \geq 8.5$. Помимо хемолитоавтотрофного роста с молекулярным водородом, новые штаммы были способны хемоорганотрофно окислять ацетат, другие органические кислоты и этанол, и не были способны к брожению. Кроме СФ, все выделенные диссимиляционные железоредукторы использовали в качестве акцептора электронов элементную серу.

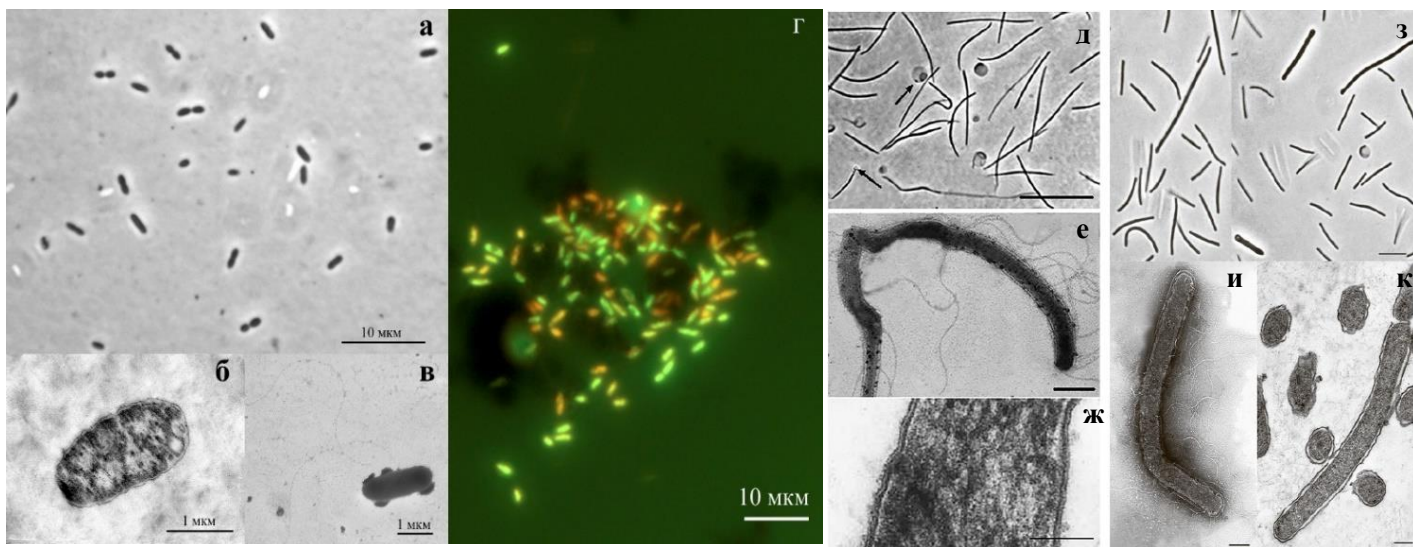


Рисунок 1. Морфология клеток *Geoalkalibacter ferrihydriticus* gen. nov., sp. nov., штамм Z-0531^T, выращенных на среде с ацетатом и ЭДТА-Fe(III) (а-в) или СФ (г). Морфология клеток *Fuchsiella alkaliacetigena* gen. nov., sp. nov. штамм Z-7100^T (д-ж) и *Fuchsiella ferrihydriticus* sp. nov. Z-7101^T (з-к). Вегетативные клетки (д, з) масштабная линейка, 10 мкм; Клетки с перитрихально расположенными жгутиками (е, и) масштабная линейка 0.5 мкм; ультратонкий срез клеток (ж, к).

Таблица 1. Главные фенотипические и таксономические характеристики новых диссимиляционных алкалофильных железоредукторов.

| Характеристики | <i>Geoalkalibacter ferrihydriticus</i> gen. nov., sp. nov. | <i>Dethiobacter alkaliphilus</i> | | <i>Fuchsiella alkaliacetigena</i> gen. nov., sp. nov. | <i>Fuchsiella ferrireducens</i> sp. nov. |
|---|---|----------------------------------|-------------------|--|---|
| | штамм | Z-0531 ^T | АНТ1 ^T | Z-1002 | Z-7100 ^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 формиат | + | +* | + | + | + |
| 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>Geoalkalibacteraceae</i> | <i>Dethiobacteraceae</i> | | - | |

*(Sorokin et al., 2008)

3.2. Новые органогетеротрофные алкалофильные железоредукторы

В ходе исследования были получены чистые культуры алкалофильных железоредукторов, осуществляющих восстановление железа за счет процесса облегченного брожения. Эти новые виды и роды бактерий оказались филогенетически и фенотипически близкими друг другу: все они являлись представителями семейства *Clostridiaceae*, мезофильными галотолерантными алкалофилами с широкими пределами роста по рН. Все выделенные бактерии оказались пептолитиками, не способными к сбраживанию сахаров или аминокислот и дыханию. Все были способны к восстановлению железа в растворимой и нерастворимой форме, а также антрахинона-2,6-дисульфоната (AQDS). При этом аэротолерантные виды, выдерживающие концентрацию кислорода 1.5-2%, не были способны к восстановлению серных соединений, в отличие от облигатно анаэробной бактерии *Isachenkonkia alkalipeptolytica* восстанавливающей серу и, в слабой степени, тиосульфат (Табл. 2).

Таблица 2. Главные фенотипические и таксономические характеристики новых органогетеротрофных алкалофильных железоредукторов.

| Характеристики | <i>Natronincola peptidovorans</i> sp. nov | <i>Natronincola ferrireducens</i> sp. nov | <i>Alkaliphilus peptidifermentans</i> sp. nov | <i>Isachenkonkia alkalipeptolytica</i> gen. nov., sp. nov |
|---|--|--|--|--|
| штаммы | 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 | - | - | + | - |
| 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> | | | |

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

Нами была протестирована способность к прямому восстановлению трехвалентного железа после трех последовательных пересевов на среде с СФ у семи видов галоалкалофильных литотрофных сульфидогенов, с использованием молекулярного водорода или формиата в качестве донора электронов (Рис. 2), а также проведен поиск в доступных на момент исследования геномах этих бактерий детерминант диссимиляционной железоредукции. К восстановлению СФ оказались способны 6 из 7 протестированных видов алкалофильных литотрофных сульфидогенов - *Desulfonatrovibrio 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., 2005), *Desulfonatronum thiodismutans*, штамм

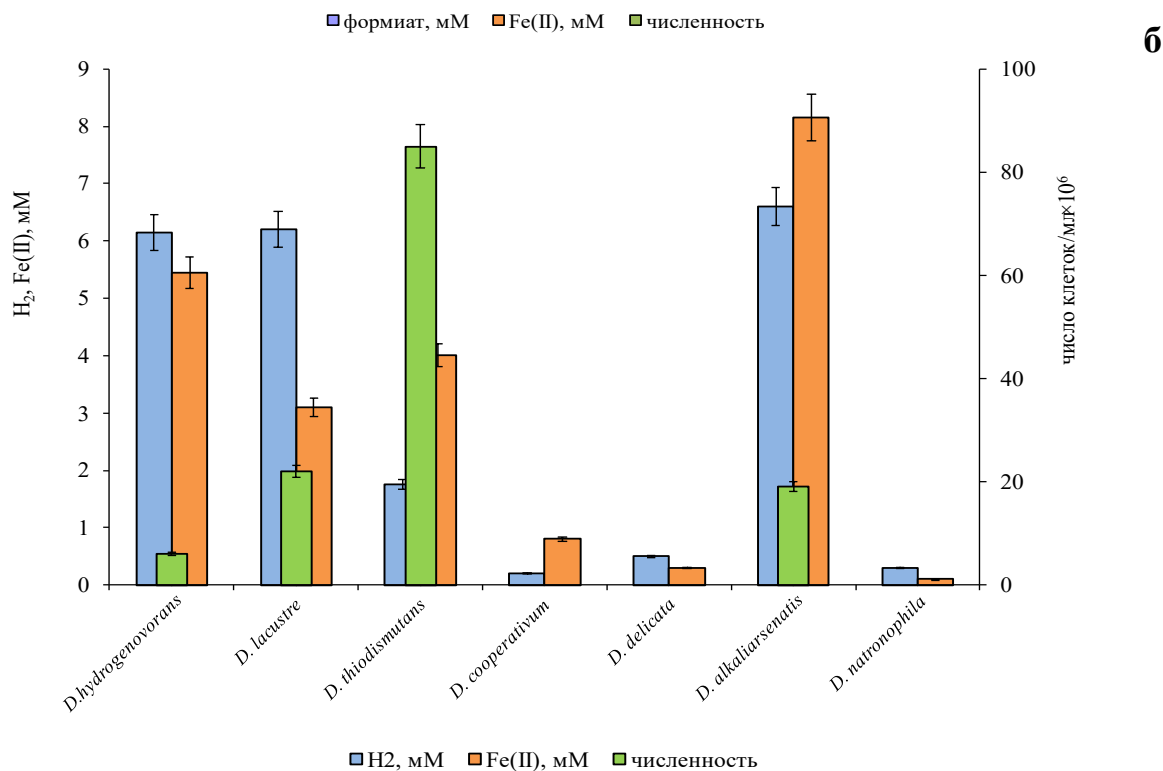
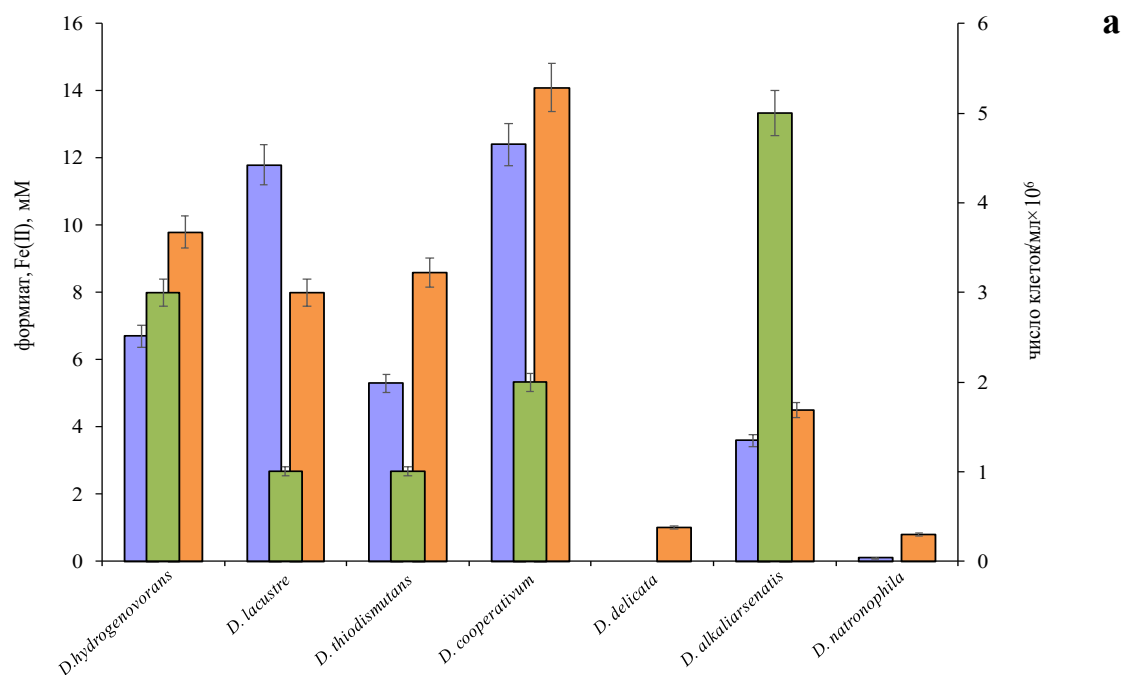


Рисунок 2. Урожай клеток, образование Fe(II) и количество потребленного формиата (а) или водорода (б) при росте гидрогенотрофных алкалофильных сульфидогенов на синтезированном ферригидрите.

MLF1^T (Pikuta et al., 2003), *Desulfuribacillus alkaliarsenatis* АНТ28^T (Sorokin et al., 2012), *Desulfurispira natronophila* АНТ11^T (Sorokin et al., 2010). *Desulfonatronospira delicate*, штамм АНТ6^T (Sorokin et al., 2008b) СФ не восстанавливал. При этом только *D. alkaliarsenatis* обладал полноценным набором генов мультигемовых цитохромов, ответственных за диссимиляционную железоредукцию, в то время как у других протестированных сульфидогенов железоредукция, по-видимому, была 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, связывающего сульфид согласно реакции $Fe^{2+} + S^{2-} + H_2O = FeS \times nH_2O$, 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. Наличие способности к прямому восстановлению нерастворимых соединений железа обнаруженное нами у представителей шести из семи протестированных известных 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

4.1.1. Влияние дополнительных акцепторов на восстановление ферригидрита *G. ferrihydriticus*

Методами Мёссбауэровской спектроскопии было проведено исследование трех серий образцов минералов железа, образовавшихся в процессе восстановления СФ *G. Ferrihydriticus*: без дополнительных акцепторов электронов, с добавлением цитрата Fe(III) или 9,10-антрахинон-2,6-дисульфоната (AQDS). При этом исходное количество Fe(III), добавляемого в среду в виде СФ, варьировалась в диапазоне от 11 до 90 мМ. Было показано, что добавление AQDS, используемого железоредукторами в качестве переносчика электронов (Bai et al., 2020), приводит к более интенсивному восстановлению СФ и увеличению относительного содержания магнетита и сидерита. Увеличение концентрации AQDS (≥ 1 мМ) приводило к возрастанию относительного количества суперпарамагнитных частиц размером 4-10 нм, в то время как в диапазоне концентраций AQDS от 0.1 до 0.7 мМ наблюдалось накопление упорядоченных наночастиц магнетита размером 8-16 нм.

4.1.2. Влияние исходного количества ферригидрита на образование новых минералов при росте *G. ferrihydriticus*

Для изучения влияния этого параметра на процесс железоредукции были исследованы две серии образцов: без и с добавлением 0.25 мМ AQDS. Для обеих серий содержание Fe(III) в СФ варьировалось в диапазоне от 5 мМ до 150 мМ, а время инкубации составило 1 месяц. При малых количествах Fe(III) 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 содержания Fe(III) от 30 мМ до 70 мМ, 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.

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

При изучении алкалофильной железоредукции было проведено исследование метабиотического взаимодействия бинарной культуры, предполагающее, что пищевая цепь складывается из звеньев, в которых железоредуктор, восстанавливающий СФ, использует продукты обмена предыдущего микроорганизма, разлагающего более сложные субстраты. Культура состояла из двух анаэробных бактерий, выделенных из осадков содового озера Хадын (Тува) - алкалофильной органотрофной анаэробной бациллы *A. alkalilacustris*, 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 водородом или органическими кислотами в качестве донора электронов. Опыты с бинарной культурой проводили при двух соотношениях «донор:акцептор» - 1:2 (O1) и 1:20 (O2). 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), а также 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.

4.2.1. Восстановление ферригидрита бинарной культурой *A. alkalilacustris* и *G. ferrihydriticus* на манните

Восстановление железа в опытах началось на третьи сутки после засева культур (Рис. 3). В первые двое суток в супернатанте наблюдались только клетки *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. 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. Изменение концентрации маннита и продуктов брожения согласовывались с данными по изменению численности бактерий. В первые сутки после начала эксперимента наблюдалось накопление формиата, этанола, ацетата и, в небольших количествах, лактата и сукцината - продуктов сбраживания маннита *A. alkalilacustris*. Далее, начиная с третьих суток, наблюдалось постепенное снижение концентрации формиата, а затем этанола на фоне увеличения концентрации ацетата. В случае избытка СФ процессы окисления формиата и этанола шли интенсивнее, чем при недостатке СФ (Рис. 3). Проведенные Мёссбауэровские исследования показали, что при недостатке СФ основным восстановленным продуктом являлся сидерит, представленный исключительно однородными по размеру сферолитами размером 3-5 мкм, в то время как при избытке СФ формировалась

магнитоупорядоченная фаза, представленная суперпарамагнитными частицами смеси магнетита и маггемита ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), неоднородных по размеру, образующих агрегаты, в которых довольно сложно было выделить отдельные кристаллы.

Таким образом, динамика развития бинарной культуры на манните и СФ обнаруживала две четкие стадии: (1) первые трое суток - сбраживание маннита *A. alkalilacustris*; (2) окончание брожения и начало окисления его продуктов *G. ferrihydriticus* за счет восстановления СФ, при последовательном использовании им в качестве доноров электронов сначала формиата, а потом этанола, что не соответствовало энергетической эффективности этих реакций, рассчитанной для условий эксперимента.

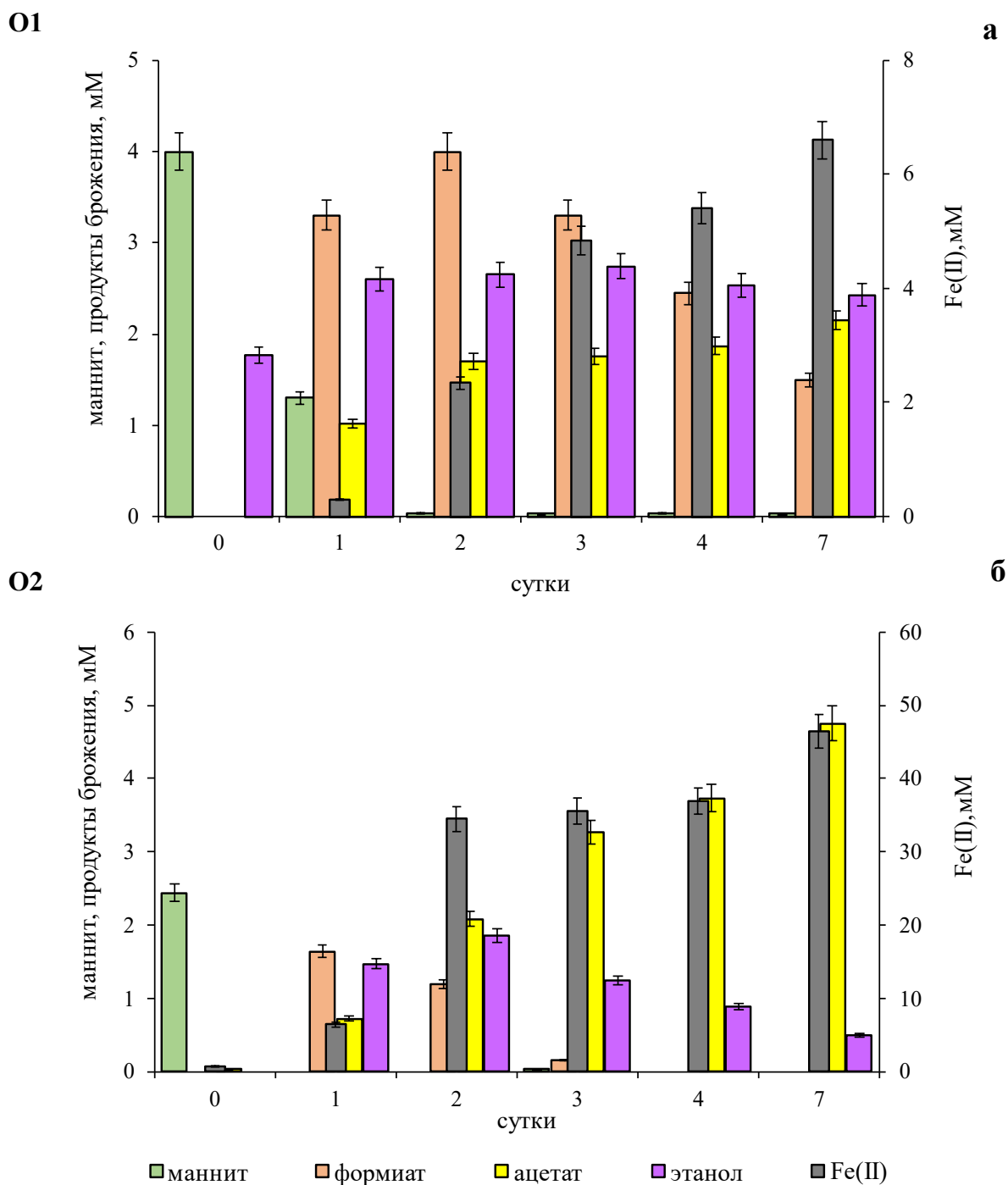


Рисунок 3. Восстановление синтезированного ферригидрита бинарной культурой *A. alkalilacustris* и *G. ferrihydriticus*: (а) при недостатке СФ, (б) при избытке СФ. Данные по лактату и сукцинату не приведены.

4.2.2. Восстановление ферригидрата *G. ferrihydriticus* с комбинацией доноров электронов

В этом случае наблюдалось последовательное использование железоредуктором добавленных доноров в порядке: формиат – этанол – лактат. В случае недостатка СФ лактат окислялся лишь наполовину. Концентрация сукцината не менялась, а концентрация ацетата возрастала, как и в опытах серий О1 и О2. 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 ферригидрата *G. ferrihydriticus* с отдельными донорами электронов

В ходе эксперимента было доказано, что все соединения, не исключая сукцината, использовались *G. ferrihydriticus* в качестве доноров электронов. При недостатке СФ и росте с этанолом или лактатом 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*, например за счет реакции гидрогенотрофного или органотрофного ацетогенеза.

4.3. Восстановление ферригидрата бинарной анаэробной культурой *Clostridium alkallicellulosi* и *G. ferrihydriticus* при разложении микрокристаллической целлюлозы

Разложение полисахаридов представляет собой первый этап биodeградации органического вещества. В простейшем случае трофическая цепочка анаэробной деструкции полисахаридов может быть представлена двумя физиологическими группами - целлюлозолитиком и хемоорганотрофом, использующим образовавшиеся продукты метаболизма в реакциях анаэробного дыхания с привлечением внешнего акцептора электронов. Комбинирование разлагающей микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ) *Clostridium alkallicellulosi* (Zhilina et al., 2005) и железоредуктора *G. ferrihydriticus* позволило смоделировать такую цепочку.

В целом характер взаимодействия *C. alkallicellulosi* и *G. ferrihydriticus* оказался сходным с таковым в бинарной культуре с *A. alkalilacustris* – железоредуктор использовал продукты, образующиеся при разложении МКЦ *C. alkallicellulosi*, 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, поэтому в первые 14 дней, несмотря на видимое восстановление СФ, не наблюдалось заметного уменьшения в концентрации продуктов метаболизма, которое началось только после перехода *C. alkallicellulosi* в стационарную фазу роста. 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 (Табл. 3). При этом концентрация ацетата постоянно увеличивалась, и к концу эксперимента более чем в 3.5 раза превышала таковую в контрольном эксперименте с чистой культурой *C. alkallicellulosi*.

Таблица 3. Продукты метаболизма, образующиеся в процессе совместного роста *C. alkallicellulosi* и *G. ferrihydriticus* на микрокристаллической целлюлозе и синтезированном ферригидрите (средние значения по двум повторностям).

| Время инкубации, сут. | 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 |

Полученные результаты экспериментов с комбинированными культурами позволили по-иному взглянуть на процессы анаэробного окисления ацетата хемоорганотрофами. Оказалось, что способность окислять ацетат в чистой культуре может быть не реализована в сообществе, где всегда существует возможность выбора донора электронов. 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, для которых ацетат является единственным донором электронов.

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

Несмотря на интенсивные исследования межвидового переноса электронов в нейтральных условиях, информация об этом типе микробной кооперации в щелочных средах очень ограничена. Каких-либо сведений о возможности синтрофного окисления органических веществ в ассоциации с гидрогенотрофными железоредукторами на момент начала настоящих исследований не было. В 2005 году нами была описана первая облигатно синтрофная алкалофильная бактерия *Ca. "C. alkalaceticum"*, окисляющая ацетат, этанол и некоторые другие органические соединения совместно с галоалкалифильными гидрогенотрофными сульфатредуцирующими бактериями рода *Desulfonatronum*. Для проверки возможности синтрофного взаимодействия *Ca. "C. alkalaceticum"* с *G. ferrihydriticus* культура спорообразующего *Ca. "C. alkalaceticum"* и *Desulfonatronum cooperativum* была подвергнута нагреванию при 80 °С в течение 10 мин, после чего сульфат был заменен на СФ и инокулирован *G. ferrihydriticus*. В качестве субстратов были протестированы все соединения, используемые синтрофом в

ассоциации с сульфидогеном. Устойчивое восстановление СФ, сопровождающееся ростом *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus*, наблюдалось только в варианте с этанолом.

4.4.1. Кинетика роста синтрофной ассоциации *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* с ферригидритом и этанолом

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

Активный рост *G. ferrihydriticus* начинался через 3 дня инкубации и сопровождался восстановлением СФ и окислением этанола с образованием эквивалентного количества ацетата (Рис. 4). Рост *Ca. "C. alkalaceticum"* начинался 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 показала, что соотношение клеток *Ca. "C.*

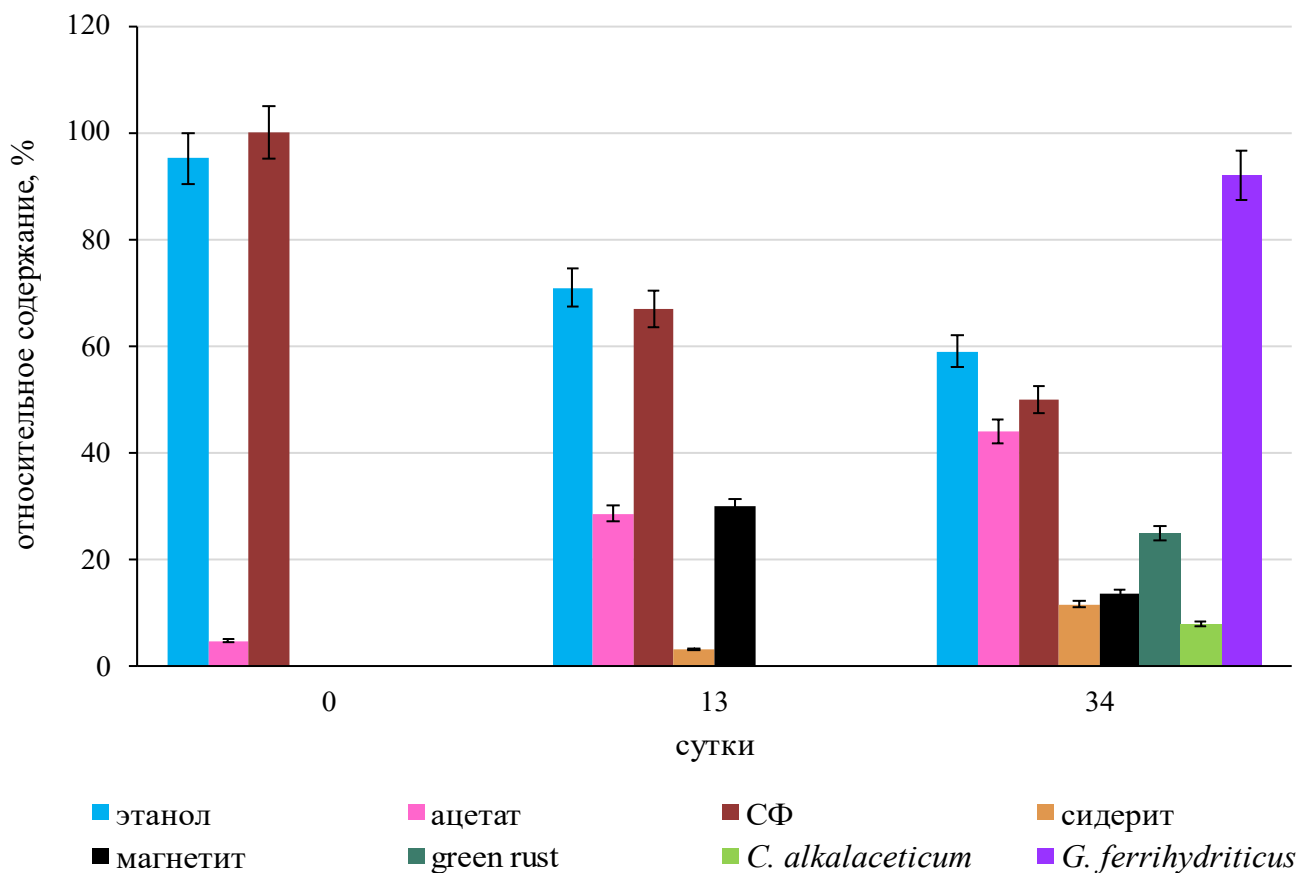


Рисунок 4. Графическое обобщение результатов экспериментов по росту *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* с синтезированным ферригидритом. Все данные выражены в процентах.

alkalaceticum" и *G. ferrihydriticus* равно 1:11 (Рис. 4, последние 2 колонки), что соответствовало обычному соотношению клеток в исходной синтрофной ассоциации с сульфидогенами.

Анализ образцов, отобранных после 5 дней инкубации, методом Мёссбауэровской спектроскопии показал, что восстановление СФ *G. ferrihydriticus* привело к образованию мелких частиц магнетит-маггемитовой смеси (30%) и сидерита (3%). После окончания эксперимента оказалось, что 16% образовавшегося магнетита было преобразовано в фужерит $[\text{Fe}^{2+}_4\text{Fe}^{3+}_2(\text{OH})_{12}][\text{CO}_3]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – гидратированный карбонат железа группы зеленой ржавчины (green rust). Кроме того, возросло общее содержание сидерита (Табл. 4). В стерильном контроле структурных изменений СФ не наблюдалось.

Таблица 4. Относительные значения интенсивности парциальных спектров, соответствующих различным позициям железа в структурах железосодержащих фаз, образовавшихся при росте *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus*.

| Время инкубации, сут. | СФ | Сидерит | Магнетит/Маггемит | Fe(III) в решетке фужерита | Fe(II) в решетке фужерита |
|-----------------------|-----------|-----------|-------------------|----------------------------|---------------------------|
| 0 | 100 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % |
| 5 | 66.9±1.1% | 3.3±0.4 % | 29.8±1.2 % | 0 % | 0 % |
| 34 | 49.7±1.5% | 11.6±1.9% | 13.6±0.8 % | 8.8±1.1 % | 16.3±1.7 % |

Таким образом, в присутствии ферригидрита, *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* конкурировали друг с другом за этанол, и рост синтрофа начинался только тогда, когда дальнейшее восстановление ферригидрита затруднялось образовавшимися восстановленными продуктами - магнетитом и сидеритом, и *G. ferrihydriticus* переключался на гидрогенотрофный метаболизм в качестве партнера *Ca. "C. alkalaceticum"*, производя дополнительное количество ацетата, как и при росте в бинарной культуре с *A. alkalilacustris* или *C. alkalicellulosi*.

Очевидно, что увеличение количества сидерита и образование фужерита, зафиксированное в конце эксперимента, было обусловлено дальнейшей трансформацией магнетита (Табл. 4) либо за счет его восстановления *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. Вероятно, после 13 дней культивирования и активного восстановления СФ *G. ferrihydriticus* начинает конкурировать с *Ca. "C. alkalaceticum"* как за донор электронов (этанол), так и за акцептор электронов (магнетит). Использование ферригидрита и магнетита *G. ferrihydriticus* в качестве акцепторов электронов для окисления 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, в нашем случае этанола.

4.4.2. Кинетика роста синтрофной культуры *Ca. "C. 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, а субстратом служил этанол. Активный рост бактерий начался через 2 недели инкубации и сопровождался окислением этанола и выделением ацетата (Табл. 5). Прямой подсчет клеток показал преобладание *Ca. "C. alkalaceticum"* после 19 дней инкубации, при соотношении клеток облигатного синтрофа и *G. ferrihydriticus* 10:1, то есть было обратным, наблюдаемому в экспериментах с ферригидритом. К концу эксперимента было потреблено 41% от исходной концентрации этанола и произведено в 1.6 раза больше ацетата, чем должно было образоваться при синтрофном росте. 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, в первую очередь, магнетита.

Таблица 5. Рост *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* на среде с этанолом (средние значения со стандартными отклонениями).

| Время, сут. | 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 культурой роста не наблюдалось. Чистая культура *G. ferrihydriticus* росла в этих условиях слабо (1.0 × 10⁶ клеток/мл), при времени удвоения 3.6 дня и образовании 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 также к успеху не привело, что еще раз подтвердило предположение о облигатно-синтрофной природе этой бактерии.

4.4.3. Геномный анализ энергетического метаболизма *Ca. "C. alkalaceticum"* и его способности к внеклеточному переносу электронов

Анализ генома *Ca. "C. alkalaceticum"* показал, что у бактерии нарушена активация ацетата через *AskA/Pta*, характерная для синтрофных ацетат-окисляющих бактерий

(Manzoor et al., 2018), однако есть гены, кодирующие АМР-образующую ацетат-КоА лигазу, которая может замещать отсутствие Pta и/или AcsA, поскольку катализирует превращение ацетата в ацетил-КоА через ацетил-АМФ (Pta и/или AcsA). Геном *Ca. "C. alkalaceticum"* содержал все гены, кодирующие путь Вуда-Льонгдаля для окисления ацетил-КоА до H_2 и CO_2 . В геноме "*Ca. C. alkalaceticum*" были обнаружены гены, кодирующие субъединицы [NiFe]-гидрогеназы, окисляющей молекулы NADH с образованием водорода, который может выступать в роли межвидового переносчика электронов между "*Ca. C. alkalaceticum*" и синтрофными партнерами. Таким образом, анализ генома позволил выявить полный набор генов, которые кодируют ферменты, необходимые для синтрофного окисления этанола и ацетата у *Ca. "C. alkalaceticum"*.

Также оказалось, что *Ca. "C. alkalaceticum"* обладает двумя различными путями внеклеточного переноса электронов к нерастворимым оксидам Fe(III): "классическим" путем, управляемым цитохромами и описанном у различных микроорганизмов, использующих Fe(III) и другие нерастворимые акцепторы электронов, и механизмом внеклеточного переноса электрона на основе флавина, недавно обнаруженного у патогенных и синтрофных грамположительных бактерий.

4.4.4. 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 этой бактерией карбоната в качестве акцептора электронов.

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

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 (Liu et al., 2015). В качестве объекта исследования нами были выбраны биотит $(K_{0.89}Na_{0.03})(Mg_{0.9}Fe^{2+}_{1.1}Al_{0.43}Fe^{3+}_{0.22}Ti_{0.09}Mn_{0.03})[Al_{1.26}Si_{2.8}O_{10}](OH,F)_2$ (Карелия, Россия) и глауконит $K_{0.8}(Mg_{0.4}Fe^{2+}_{0.1})(Fe^{3+}_{1.1}Al_{0.4})[(Si_{3.7}Al_{0.3})O_{10}](OH)_2$ (месторождение Маарду, Эстония), как наиболее распространенные железосодержащие слюды, при этом малоизученные в отношении использования их в качестве источника энергии для хемосинтезирующих микроорганизмов. Химический состав обоих минералов был определен методом рентгеновской флуоресцентной спектроскопии (XRF), а соотношение Fe^{3+}/Fe^{2+} - с помощью Мёссбауэровской спектроскопии.

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

Эксперименты проводили в оптимальных условиях роста железоредуктора с ацетатом (10 мМ) в качестве донора электронов. Парадоксальным образом, в течение первых дней эксперимента концентрация ацетата не снижалась, а, напротив, увеличивалась примерно на 3 мМ с обоими минералами (Рис. 5а). Через 14 дней инкубации концентрация ацетата достигла максимума и стабилизировалась. Мёссбауэровский 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, представлявшей смесь магнетита и маггемита с расчетным диаметром частиц ~9 нм (Рис. 5б), составлявшей 10.7% в случае биотита и

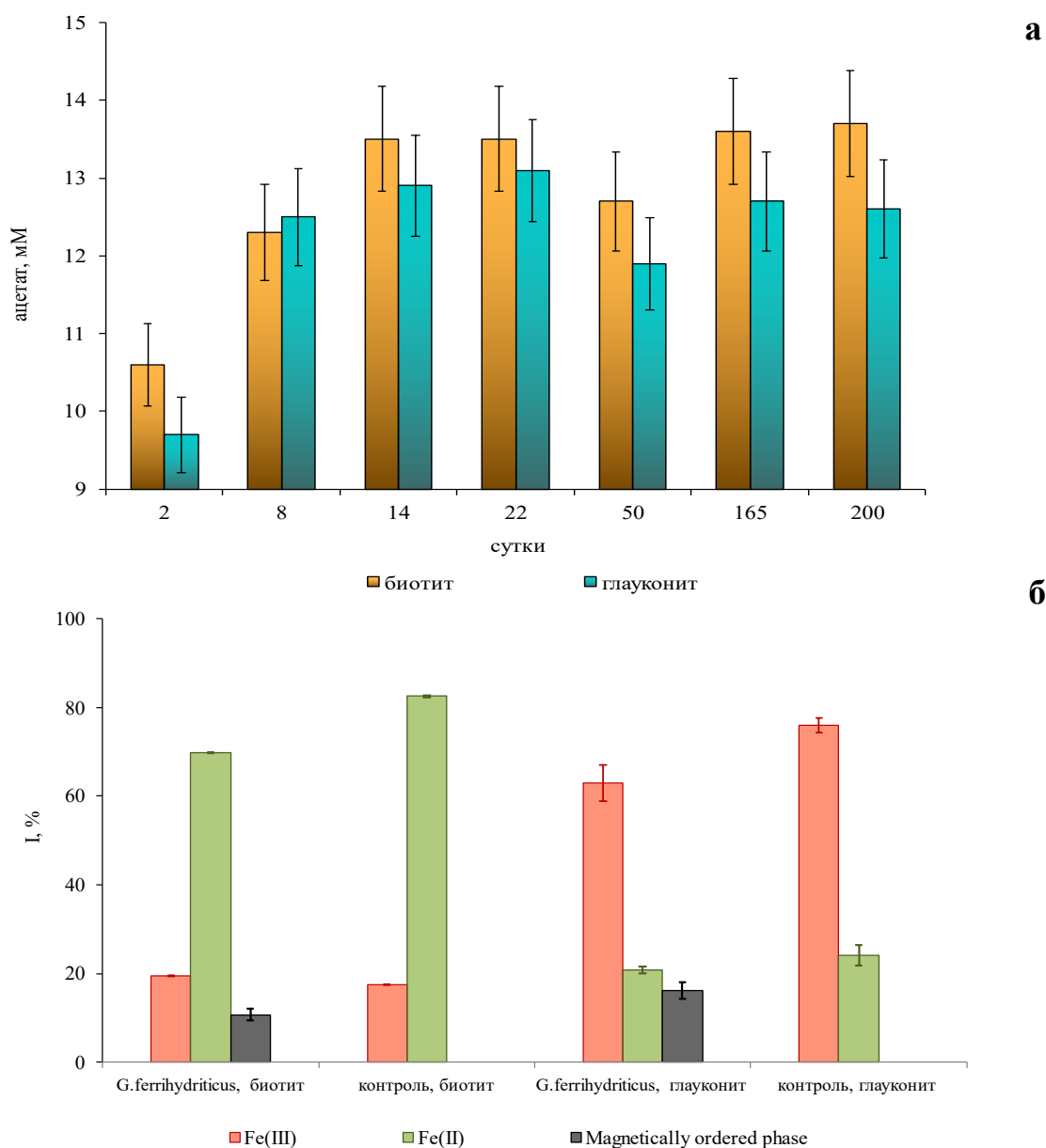


Рисунок 5. (а) Увеличение концентрации ацетата в процессе роста *Geoalkalibacter ferrihydriticus* с биотитом и глауконитом. (б) Образование магнитоупорядоченной фазы и изменение содержания атомов двух- и трехвалентного железа в биотите и глауконите по окончании эксперимента, определенные методом Мессбауэровской спектроскопии.

16.2% в случае глауконита.

При этом образование магнитоупорядоченной фазы сопровождалось твердофазным перераспределением атомов железа в кристаллической решетке слюд в сторону увеличения относительного количества атомов Fe^{3+} , то есть в результате роста *G. ferrihydriticus* происходило окисление Fe^{2+} , а не восстановление Fe^{3+} .

Объяснить наблюдаемое образование дополнительного ацетата и уменьшение количества Fe^{2+} можно было только способностью *G. ferrihydriticus* к анаэробному окислению Fe^{2+} при использовании его в качестве донора электронов, а карбоната в качестве акцептора электронов. Поскольку 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, равно как и способности использовать водород в качестве донора электронов в отсутствие СФ для осуществления этой реакции, требуются дальнейшие исследования, чтобы прояснить биохимию этого процесса. Способность к анаэробному окислению железа, напротив, нашла подтверждение при анализе его генома, который показал наличие у *G. ferrihydriticus* мультигемового цитохрома MtoA с-типа, а также хинон-окисляющего цитохрома MtoC, входящих в состав порин-цитохромного MtoABCD комплекса, ответственного за окисление Fe^{2+} (Shi et al., 2012; Liu et al., 2012).

Для проверки принципиальной возможности получения энергии от окисления Fe(II) в щелочных условиях были проведены термодинамические расчеты для экспериментальной системы с биотитом, которые в высокой степени совпали с экспериментальными данными.

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 - хемоорганотроф, 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. В качестве контрольного эксперимента был поставлен опыт с чистой культурой *C. alkallicellulosi* в присутствии минералов и без них.

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 pH, по сравнению с опосредованным биологическим воздействием. В ходе эксперимента наблюдалось увеличение концентрации ацетата и этанола при практически неменяющейся концентрации формиата и лактата, а также появление магнитоупорядоченной фазы за счет окисления Fe^{2+} . В то же время анализ продуктов метаболизма, накапливающихся при разложении целлюлозы *C. alkallicellulosi* в присутствии и отсутствии биотита или глауконита, показал, что присутствие минералов изменяет соотношение продуктов, практически полностью подавляя выработку лактата. Одним из возможных объяснений этого необычного, но экологически значимого явления, заключается в том, что элементы со смешанной валентностью, входящие в

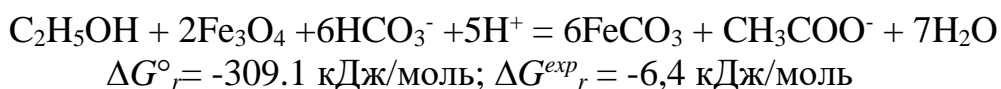
состав исследуемых минералов, действуют как поглотители электронов, в результате чего может снижаться продукция восстановленных соединений и изменяться конечное соотношение образующихся метаболитов.

5.2. Трансформация магнетита алкалофильными анаэробами

Выявленные особенности синтрофного взаимодействия в присутствии ферригидрита показали, что магнетит может восстанавливаться алкалофильными железоредукторами до сидерита, с этанолом как донором электронов. 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 показали, что восстановление магнетита в условиях эксперимента возможно в случае неполного окисления этанола и энергетически невыгодно с ацетатом или водородом в качестве доноров электронов:



Проведенные опыты показали, что, действительно, *G. ferrihydriticus* способен использовать магнетит в качестве акцептора электронов, с образованием ацетата в качестве продукта неполного окисления этанола, и сидерита как единственной восстановленной фазы, образующейся при трансформации магнетита. Медленный рост и относительно низкая численность бактерии (5×10^6 кл/мл) по сравнению с ростом на СФ в аналогичных условиях объяснялась низким выходом энергии этой реакции при щелочных значениях pH.

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

Эксперименты проводили при разных количествах СМ (с расчетным количеством Fe(II) 2, 10, 25 мМ) в присутствии этанола на среде Хадын. 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 СМ, были сходными: на первом этапе наблюдался рост *G. ferrihydriticus*, сопровождавшийся окислением 1-3 мМ этанола и образованием сидерита; на втором этапе, связанным с активным ростом *Ca. "C. alkalaceticum"*, интенсивным окислением этанола и образованием ацетата, происходило окисление железа и накопление в качестве окисленной фазы маггемита и мелких магнитных наночастиц размером менее 10 нм, также представляющих собой смесь магнетита и маггемита. После 60 дней инкубации, по данным анализа кПЦР, клетки *Ca. "C. alkalaceticum"* составляли 60–85% от числа клеток бинарной культуры, а этанол был полностью окислен.

Исследование формирования биопленки на поверхности магнетита методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) показало, что клетки обеих бактерий

были связаны друг с другом и с поверхностью магнетита пиллями толщиной около 10 нм (Рис. 6).

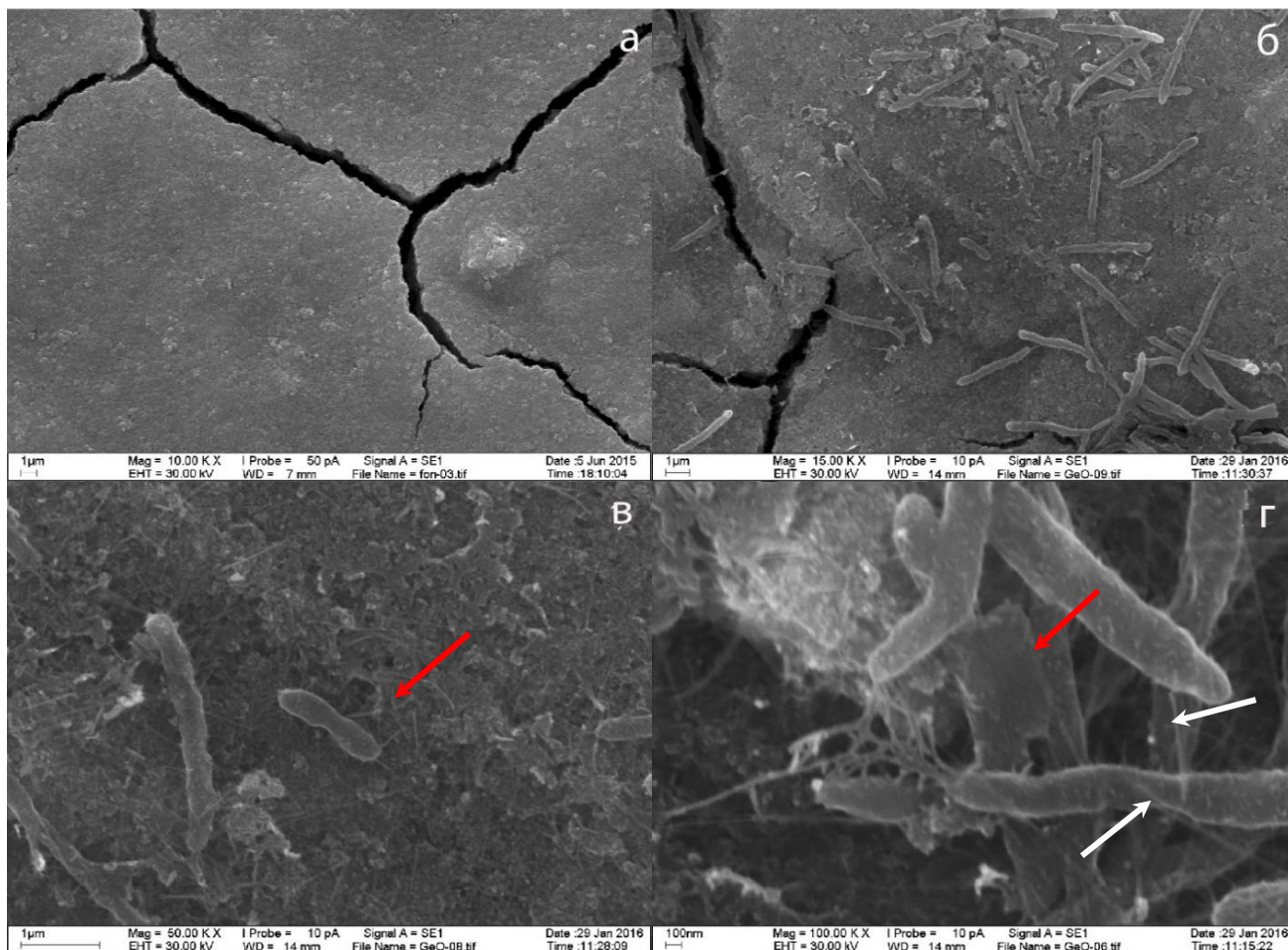


Рисунок 6. Микрофотографии СЭМ контрольного абиогенного эксперимента (а) и биопленки (б-г), образованной бинарной культурой *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* (красные стрелки) на магнетите, выполненные при разных увеличениях. Белыми стрелками показаны пилли, соединяющие бактериальные клетки между собой и поверхностью минералов.

Полученные результаты нашли подтверждение при анализе геномов бактерий: гомолог электропроводящего пилина *Geobacter sulfurreducens* (Holmes et al., 2016) был идентифицирован в геноме *G. ferrihydriticus*, а в геноме *Ca. "C. alkalaceticum"* был выявлен полный набор генов для производства пилей IV типа, для которых ранее была показана функция переноса электронов (Melville and Craig, 2013). Обнаружение тесного контакта между клетками *G. ferrihydriticus*, *Ca. "C. alkalaceticum"* и частицами магнетита, обеспечиваемого пиллями, а также наличие у обеих бактерий мультигеновых цитохромов является весомым аргументом в пользу предположения о том, что бактерии используют механизм прямого переноса электронов при синтрофном взаимодействии, а магнетит используется в качестве переносчика электронов. Обнаружение у *Ca. "C. alkalaceticum"* мультигенового цитохрома, имеющего гомологию с предполагаемыми терминальными Fe(III) редуктазами железоредукторов (MtrA из *Shewanella oneidensis* и OmhA из *Carboxydotherrmus ferrireducens*, ОмсХ из *Geobacter sulfurreducens*) означает, что синтрофная бактерия обладает возможностью сбрасывать электроны на содержащие трехвалентное железо минералы. В свою очередь, *G. ferrihydriticus* располагает не

только железоредуктазами, но и цитохромами, гомологичными MtoA, обнаруженными у анаэробных железоокисляющих бактерий и, следовательно, имеет механизм принятия электрона от минералов, содержащих двухвалентное железо. По-видимому, неспособность этой синтрофной культуры расти в отсутствие хотя бы следовых количеств минералов железа объясняется невозможностью в этом случае активировать механизм прямой передачи электронов через минералы железа и/или пили.

Наиболее интригующим вопросом, появившимся в результате проведенных экспериментов, является вопрос о причине, по которой *G. ferrihydriticus* переключается с самостоятельного роста на ферригидрите и магнетите на синтрофное взаимодействие с *Ca. "C. alkalaceticum"*.

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

Проведенные исследования показали, что двухвалентное железо, входящее в состав смешанновалентных минералов железа, может использоваться анаэробными алкалофильными бактериями в качестве донора электронов. 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 и, благодаря простому составу, удобным объектом для экспериментальных исследований.

6.1. Анаэробное окисление сидерита *Fuchsiella ferrireducens*

Выявленный нами процесс анаэробного окисления железа в отсутствие света и нитратов, восстановленным продуктом которого являлся ацетат, давал повод предположить, что автотрофные алкалофильные ацетогены, обладающие путем Вуда-Льонгдаля для фиксации CO_2 и восстановления карбонатов и одновременно способные к трансформации минералов железа, являются наиболее вероятными кандидатами к осуществлению такого процесса. Проведенные эксперименты с *F. ferrireducens* показали, что, несмотря на подтвержденную способность исследуемой бактерии использовать карбонат в качестве акцептора электронов за счет пути Вуда-Льонгдаля, доказанную способность к диссимиляционной хемолитотрофной железоредукции и потенциальную способность к анаэробному окислению железа, обусловленную присутствием в геноме этой бактерии мультигемовых цитохромов - компонентов железоредуктазного и железоокислительного комплексов, *F. ferrireducens* оказалась способной окислять сидерит только в присутствии этанола.

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

Для выяснения способности этой бактерии анаэробно окислять двухвалентное железо были проведены эксперименты 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%) (Табл. 6). Урожай клеток штамма Z-1002 в заданных условиях составлял 10^7 клеток/мл после 34 дней инкубации. Мёссбауэровский анализ минералов, отобранных по завершении роста и стерильных контролей, показал в выросших культурах снижение относительной суммарной интенсивности спектров, соответствующих атомам

двухвалентного железа, с $87.7 \pm 2.9\%$ до $78.2 \pm 0.9\%$, (Табл. 6). В контроле таких изменений не наблюдалось. При этом относительная интенсивность спектра сидерита, подвергнутого 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. 6). Таким образом, 75% атомов двухвалентного железа, содержащихся в фужерите, были окислены, но в то же время содержание атомов Fe^{3+} в этой фазе увеличилось более чем на 50%. В конце инкубации было зафиксировано также увеличение содержания магнитно-упорядоченной фазы на 4.2%. Единственным органическим 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. 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 железооксидаз MtoA-типа, а также гомологи вспомогательных мембранных цитохромов, участвующих в железоредукции у представителей *S. oneidensis* и *G. sulfurreducens* (Shi et al., 2012).

Таблица 6. Относительные интенсивности Мёссбауэровских спектров, соответствующих позициям ионов Fe^{3+} и Fe^{2+} в кристаллической решетке слюды и магнитоупорядоченной фазы в контролях и опытах после 200 дней инкубации бинарной культуры *C. alkalicellulosi* и *G. ferrihydriticus*.

| Спектры | Фазы | I, % контроль | I, % опыт |
|----------------|-----------------------|---------------|-----------|
| D ₁ | сидерит | 76.3±2.0 | 76.1±0.7 |
| D ₂ | фужерит (Fe^{2+}) | 8.4±2.1 | 2.1±0.6 |
| D ₃ | фужерит (Fe^{3+}) | 2.2±0.5 | 4.6±0.4 |
| S | оксиды железа | 13.0±0.4 | 17.2±0.4 |

Полученные результаты, подтвердили способность *D. alkaliphilus* анаэробно окислять закисное железо в автотрофных условиях. Акцепторами для *D. alkaliphilus* могли выступать либо карбонат, либо трехвалентное железо, входящее в состав фужерита и оксидов железа. Наличие у *D. alkaliphilus* пути Вуда-Люнгдаля и железооксидаз допускало оба варианта. Однако проведенные кинетические эксперименты в сочетании с данными Мёссбауэровского анализа указывают на то, что, скорее, акцептором электронов является трехвалентное железо, или же *D. alkaliphilus* использует карбонат и трехвалентное железо одновременно.

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

Эксперименты проводили с добавлением этанола (25 мМ) в качестве субстрата для облигатного синтрофа. Порошок сидерита добавляли из расчета финального содержания Fe^{2+} 25 мМ. Окисление сидерита сопровождалось окислением этанола, образованием ацетата и увеличением концентрации клеток обоих микроорганизмов (Рис. 7). Результаты профилирования фрагментов гена 16S рРНК показали, что соотношение между клетками *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* составляет 32:1. В конце

эксперимента было израсходовано 21.8 ± 1.4 мМ этанола и образовано 32.6 ± 2.9 мМ, что в 1.5 раза превышало концентрацию, рассчитываемую по количеству израсходованного этанола.

Мёссбауэровский анализ показал, что во время роста бактерий примерно 10% сидерита трансформировалось в фужерит и магнетит, доля которых варьировалась в разных повторностях: 10.5-4.3% и 1.2-5.2%, соответственно. Общая интенсивность спектров, соответствующих атомам Fe(III) в минеральной фазе, в среднем составила около 4%, что однозначно указывало на процесс анаэробного окисления сидерита, не наблюдающегося в стерильном контроле (Табл. 7).

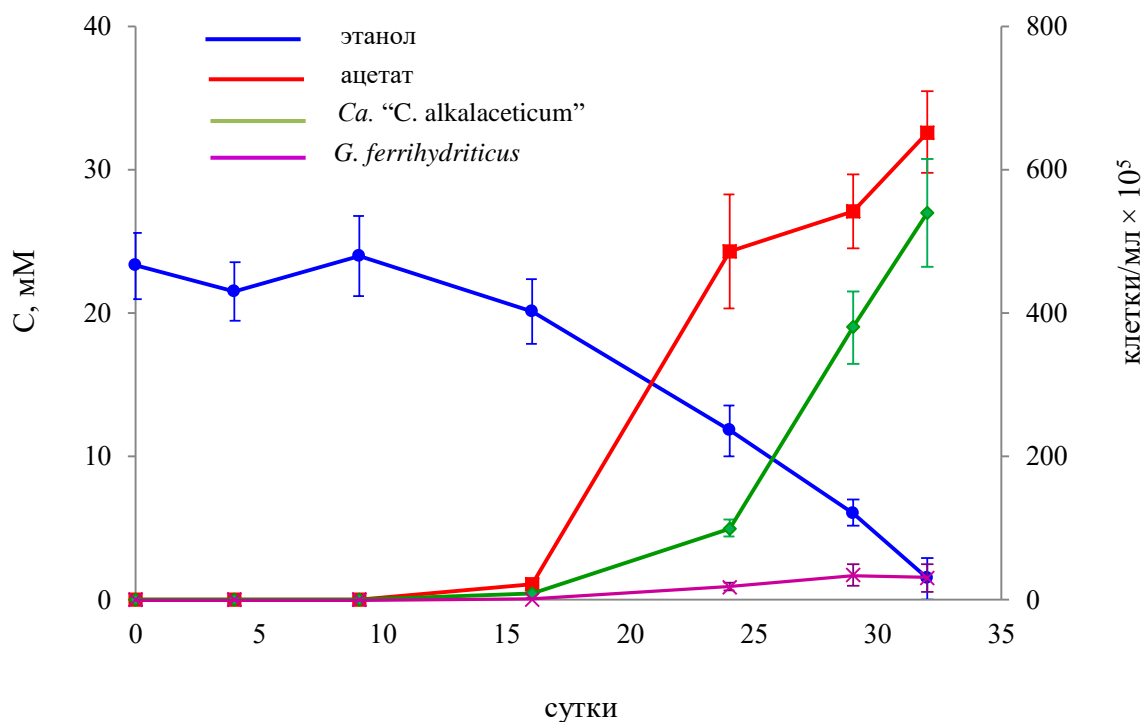


Рисунок 7. Кинетика роста синтрофной культуры *Ca. "C. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus* на сидерите.

Таблица 7. 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] ₃ ·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 % |

Таким образом, исследования синтрофных взаимодействий в присутствии железосодержащих минералов разной степени окисленности позволили подтвердить способность *G. ferrihydriticus* к анаэробному окислению закисного железа и образованию ацетата в качестве восстановленного продукта, а также показать, что при механизме прямого переноса электронов между синтрофными партнерами облигатные

синтрофы получают значительное преимущество, что отражается на соотношении клеток синтрофа и бактерии-партнера и приводит к полному окислению исходного субстрата, в нашем случае этанола. Присутствие в среде электропроводящего магнетита стимулирует процесс передачи электронов между микроорганизмами-партнерами и коррелирует с 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. Обобщенная схема синтрофных взаимодействий в присутствии минералов железа разной степени окисленности представлена на рисунке 8.

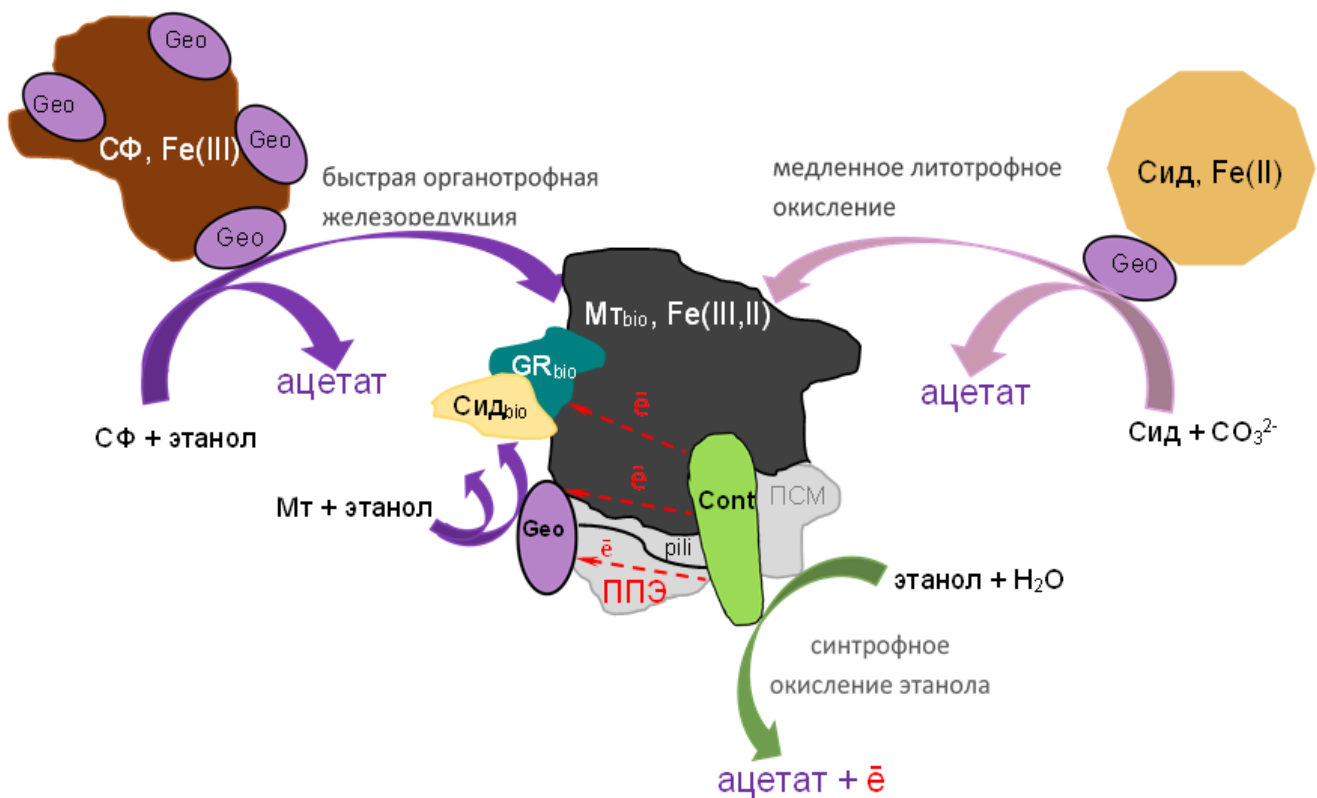


Рисунок 8. Обобщенная схема взаимодействия синтрофной культуры *Ca*. "*C. alkalaceticum*" и *G. ferrihydriticus* с минералами железа. Сокращения: Geo - *G. ferrihydriticus*; Cont - *Ca*. "*C. alkalaceticum*"; Сид - гидротермальный сидерит; Сид_{био} - биогенный сидерит; Мт_{био} - биогенный магнетит; GR_{био} - биогенный фужерит; 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 магнетит; перенос электронов через пили; ПСМ как переходная среда для переноса электронов через внеклеточные цитохромы.

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

Коррозия железа, представляющая собой серьезную экономическую и экологическую проблему, в анаэробных условиях в основном бывает вызвана деятельностью микроорганизмов (Dinh et al., 2004). Наиболее разрушительное воздействие на металлическое железо оказывают микроорганизмы, способные к

внеклеточному переносу электронов и стимулирующие катодную реакцию на поверхности стали (Dinh et al., 2004; Mori et al., 2010, Kato et al., 2015, 2016; Emerson, 2018). Присутствие организмов, обеспечивающих биокоррозию в щелочной среде, может приводить к ускоренному повреждению контейнеров из нержавеющей стали для хранения ядерных отходов, содержащихся в бетонных бункерах, поскольку при взаимодействии бетона с водой образуются щелочные растворы (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). Информация о биокоррозии в щелочной среде очень ограничена: существует лишь несколько работ, в которых продемонстрирована способность алкалофильных железо- и сульфатредуцирующих бактерий вызывать коррозию углеродистой стали (Lee et al., 2014; Tran Thi Thuy et al., 2020; Yadav et al., 2023).

В опыте использовали стальную проволоку, имеющую состав $Fe_{0.98}Mn_{0.02}$. В процессе инкубации цвет проволоки менялся от металлического до черного; при этом наблюдалось образование пузырьков газа, за счет которых она всплывала на поверхность среды (Рис. 9). Единственным детектированным продуктом, образующимся в процессе роста *G. ferrihydriticus*, был H_2 , концентрация которого достигала 9 мМ. Число клеток *G. ferrihydriticus*, определенное методом кПЦР, не превышало 4×10^6 клеток/мл.

Поверхность проволоки была интенсивно корродирована и покрыта гексагональными таблитчатыми кристаллами (Рис. 10), характерными для фужерита (Legrand et al., 2004). На дне флаконов образовывался осадок, по данным Мёссбауэровского анализа представленный смесью сидерита и фужерита.

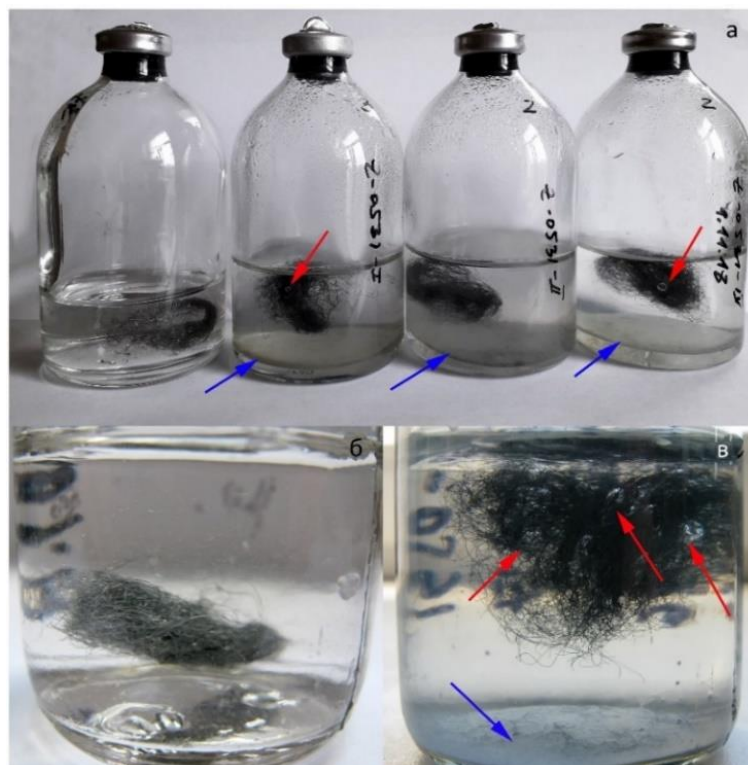


Рисунок 9. Изменение цвета стальной проволоки, сопровождающееся образованием пузырьков газа (красные стрелки (а,в)) и осадка (синие стрелки (а,в)) после 180-дневной инкубации с *G. ferrihydriticus*. Левый флакон (а,б) - стерильный контроль; правые три флакона (а)- три последовательных пересева.

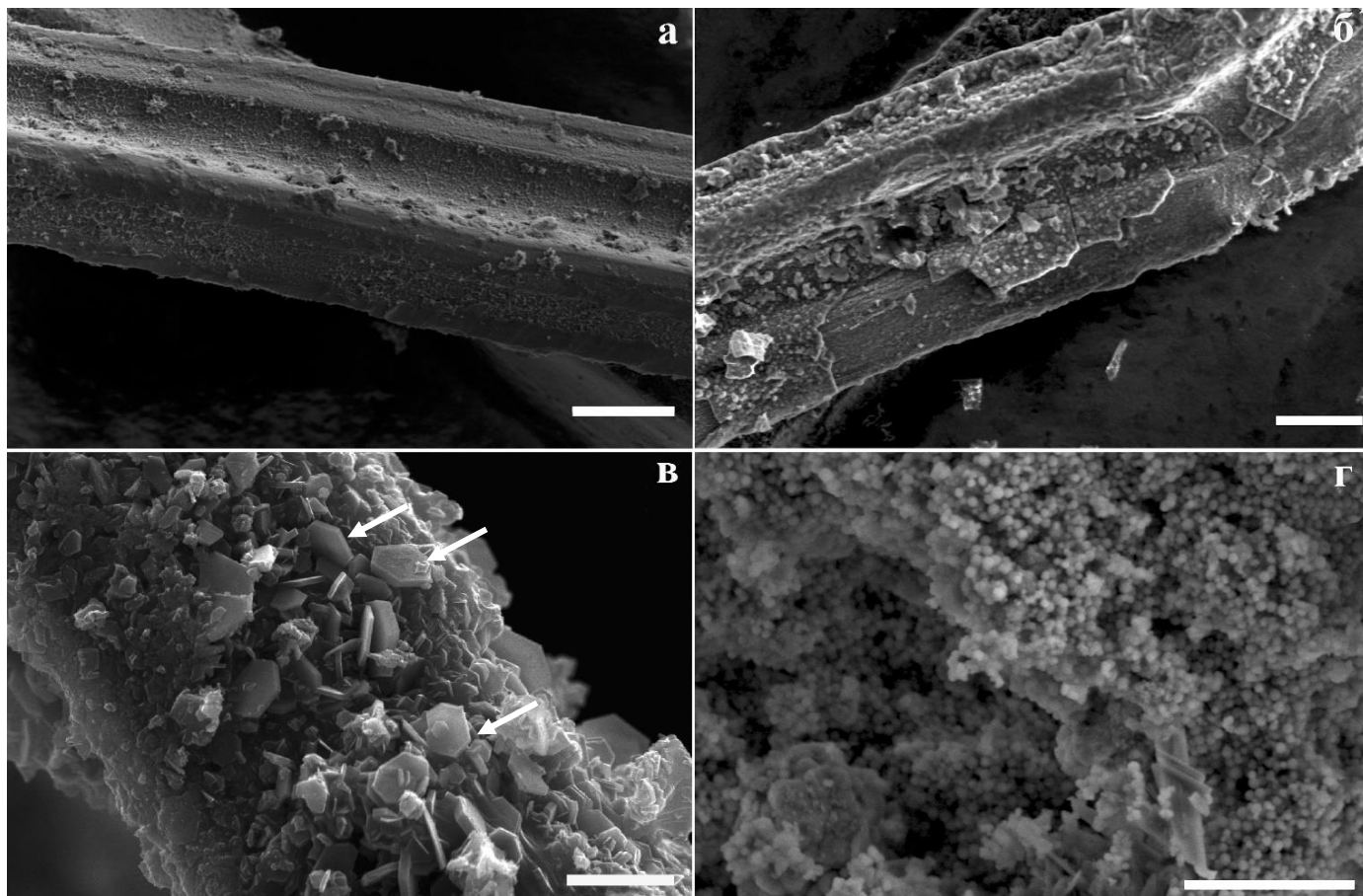


Рисунок 10. Микрофотографии стальной проволоки, выполненные методом СЭМ, после 180-дневной инкубации с *G. ferrihydriticus*: (а) стальной проволока контроль; (б-в) стальной проволока опыт; (в) кристаллы фужерита (стрелки), сформированные на поверхности стальной проволоки; (г) микрофотографии осадка, сформированного во время роста *G. ferrihydriticus*, содержащего сферические кристаллы сидерита. Масштабная линейка (а, б) = 20 мкм; (в, г) = 5 мкм.

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 как атомы закисного, так и атомы окисного железа. Скорость и интенсивность биогенного процесса значительно превышали аналогичные значения в стерильных контролях. Учитывая выявленную нами ранее способность *G. ferrihydriticus* как окислять, так и восстанавливать железо, его метаболическая активность в данном случае могла быть обусловлена двумя разными процессами - либо гидрогенотрофным восстановлением электрохимически образованного $Fe(III)$ (Рис. 11 сценарий I), либо прямым метаболическим окислением Fe^0 с протонами, выступающими в качестве вероятных акцепторов электронов (Рис. 11 сценарий II).

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). 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 с3 в качестве донора или акцептора электронов в реакциях восстановления протона, или окисления водорода (Higuchi, 1997). Можно предположить, что такая гидрогеназа у *G. ferrihydriticus* является частью цепи переноса электронов от Fe(II) через цитохромы на протон, при использовании его в качестве акцептора электронов при анаэробном окислении сидерита. Таким образом, учитывая активное выделение водорода, сценарий с прямым окислением металлического железа представляется более вероятным.

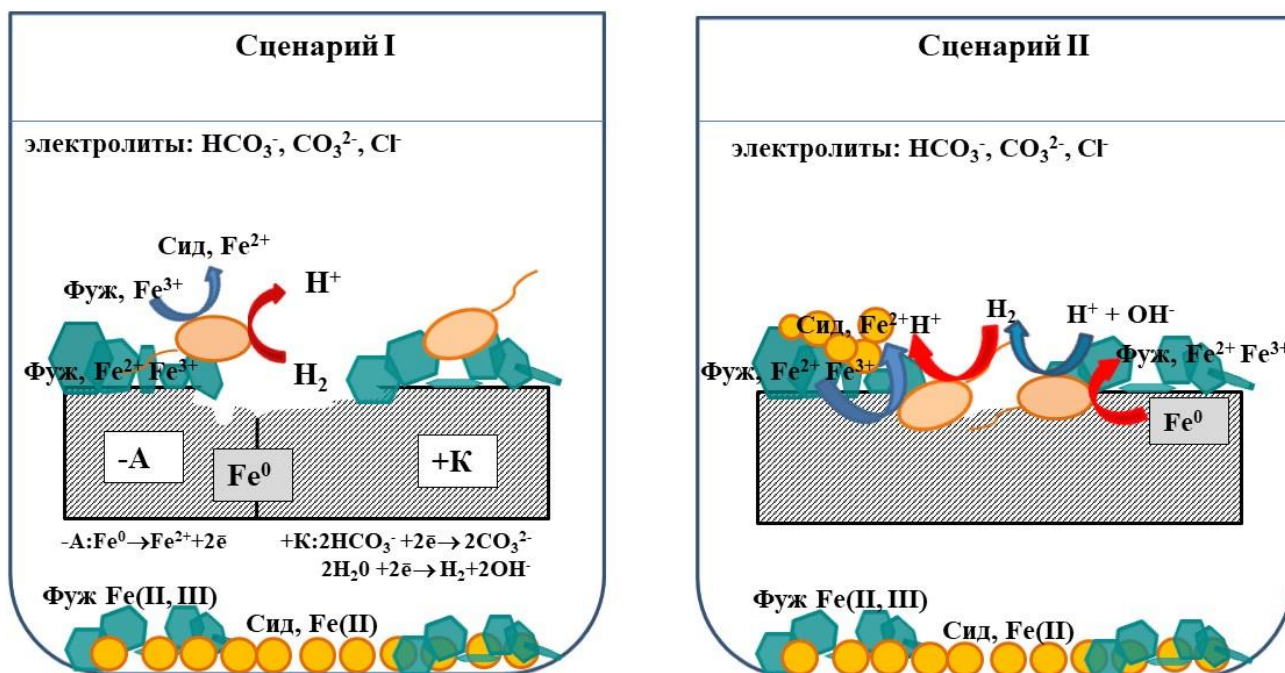


Рисунок 11. Схема предполагаемых коррозионных процессов, активируемых *G. ferrihydriticus*. Сценарий I - не прямой процесс, основанный на электрохимической коррозии. Сценарий II - процесс, вызванный прямым окислением металлического железа *G. ferrihydriticus* с последующим возможным литотрофным восстановлением фужерита в сидерит. Сокращения: Сид - сидерит; Фуж - фужерит; -А - анод; +К - катод.

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

Проведенные экспериментальные исследования трансформаций минералов железа с чистыми и бинарными культурами анаэробных бактерий показали их способность использовать железо в качестве акцептора или донора электронов. Однако для оценки значимости полученных результатов как для современных, так и для древних экосистем важно было оценить возможность существования анаэробных микробных сообществ 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

Нами были проведен лабораторный эксперимент с накопительной культурой из донных отложений озера Хадын, полученной путем последовательных пересевов с

синтезированным магнетитом, сидеритом или искусственной смесью минералов, соответствующей усредненному составу континентальной коры. Источником углерода служил только карбонат-бикарбонатный буфер. Исходно филогенетически разнообразное микробное сообщество (Рис. 12, первая колонка) 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.

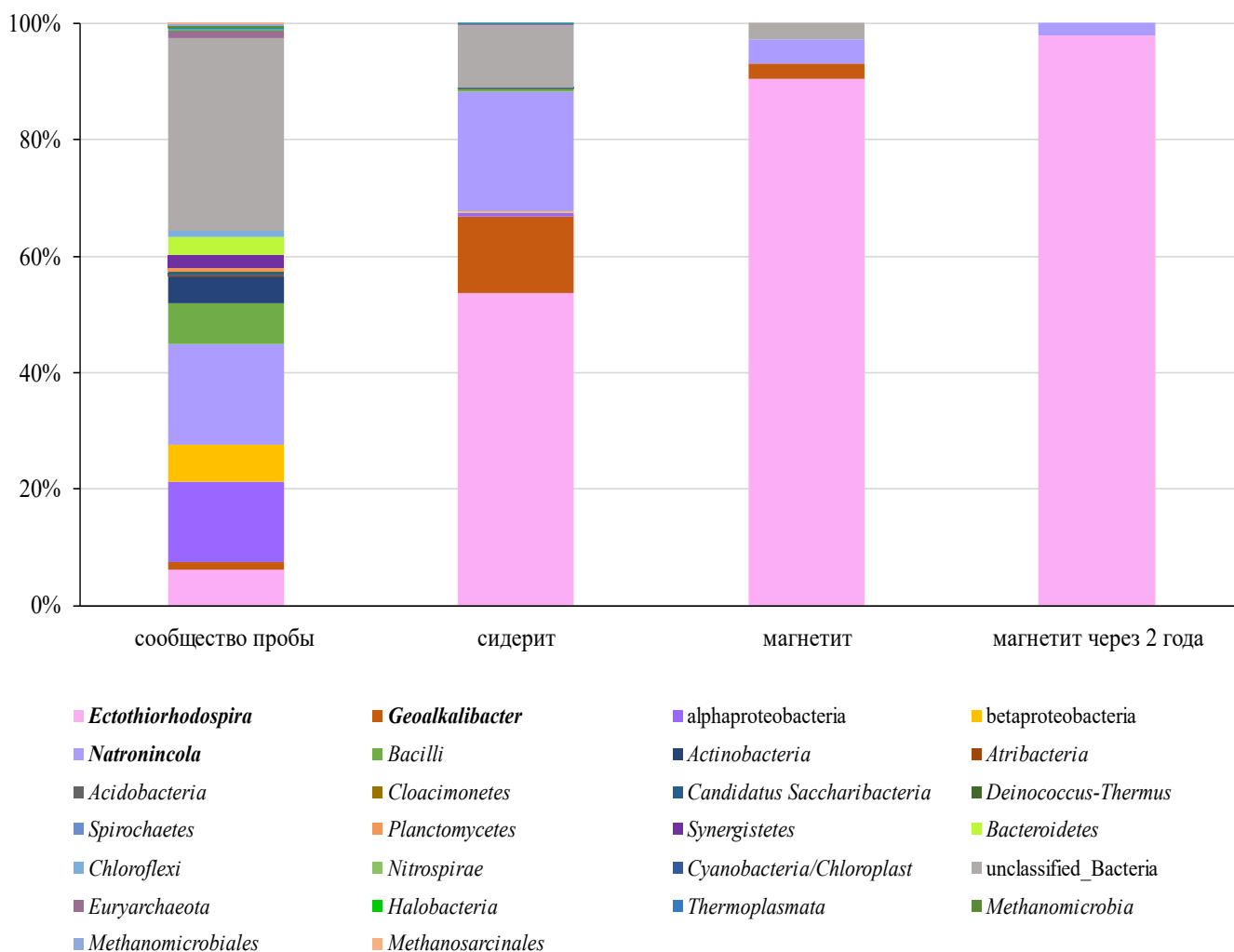


Рисунок 12. Изменение таксономического состава фототрофного сообщества при длительном культивировании с минералами.

Проведенные Мёссбауэровский и рентгеноспектральный анализы показали, что в процессе развития микробного сообщества в минералах происходит перераспределение атомов двух- и трехвалентного железа, с увеличением доли трехвалентного железа. Рентгеноспектральный анализ смеси минералов, имитирующей усредненный состав

континентальной коры, показал существенное уменьшение доли биотита в опытном образце по сравнению с контрольным (Рис. 13). В результате дальнейших пересевов, проводимых на сидерите и на магнетите на свету в течение двух лет, микробное сообщество преобразовалось в бинарную культуру, состоящую из аноксигенных фототрофов рода *Ectothiorodospira* и представителей рода *Natronincola* (Рис. 12, последняя колонка). Измерения продуктов метаболизма, образующихся в процессе роста этой культуры, показали присутствие следовых количеств ацетата (0.1 - 0.4 мМ) в качестве единственного продукта.

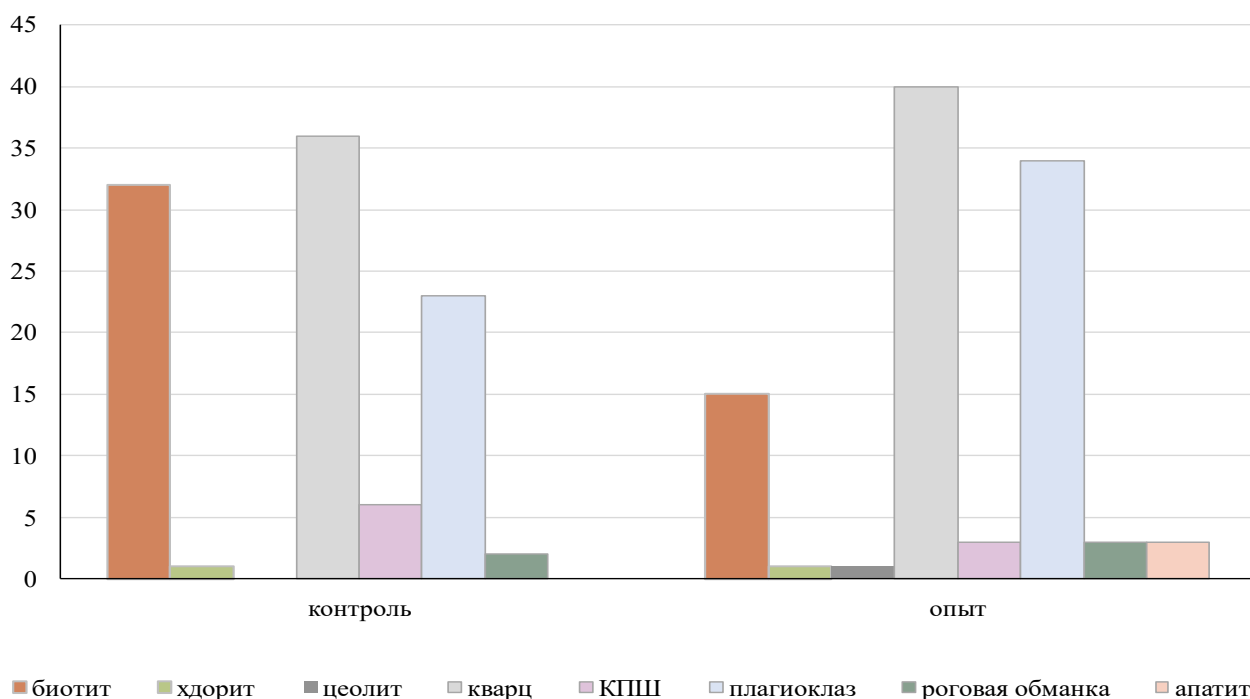


Рисунок 13. Изменения в составе «континентальной коры» под воздействием анаэробного фототрофного сообщества из озера Хадын, по данным рентгеноспектрального анализа. Сокращения: КПШ – калиевые полевые шпаты.

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

По данным геномного анализа, аноксигенная фототрофная бактерия, обозначенная нами как штамм Z-2002PH, имела высокий (99%) уровень сходства последовательности гена 16S рРНК с типовым штаммом *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*, являясь, таким образом, штаммом этого вида. 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 в присутствии минералов железа рост культуры прекращался. Проведенный анализ генома выделенного штамма Z-2002PH показал наличие у него кластеров генов, гомологичных оперону *pio*, обуславливающему фототрофное

окисление Fe(II) у *Rhodopseudomonas palustris*.

Ближайшим родственником выделенной в чистую культуру анаэробной бактерии-спутника фототрофа, обозначенной как штамм Z-2001PH, была ацетогенная бактерия *Natronincola histidinovorans* (уровень сходства по данным анализа 16S рРНК 92.37%), выделенная из содового озера Магади (Кения). Таким образом, по данным геномного анализа выделенный штамм являлся новым родом в семействе *Halanaerobiaceae*. Анализ метаболических возможностей выделенной бактерии показал, что она способна к росту на пептидах, этаноле, а также к литотрофному росту на водороде. При этом единственным продуктом, образующимся в процессе роста, был ацетат. Штамм Z-2001PH оказался неспособным к железоредукции или железоокислению, что подтвердилось полным отсутствием соответствующих детерминант в его геноме.

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*, для которых была выявлена неизвестная ранее способность к анаэробному фотозависимому окислению железа; в бинарной культуре рост *Ectothiorhodospira* стимулировался продукцией ацетата, осуществляемой органотрофной ацетогенной бактерией, близкой к роду *Natronincola*.

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

В связи с проведенными экспериментальными исследованиями и литературными данными, касающимися условий формирования железистых формаций докембрия и вклада биогенных процессов в эти процессы (Köehler et al., 2010; Bekker et al., 2013; Klein, 2005), было важно экспериментально проверить возможность существования анаэробного термофильного сообщества, развивающегося в интервале рН 6.5-7.0 в безсульфатной карбонатной среде, не содержащей органики, и 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 (Камчатка), характеризующегося исключительно высоким микробным биоразнообразием (Menzel et al., 2015). Накопительная культура была получена на бикарбонатной среде с гидротермальным сидеритом (рН 6.8, Т 60°C) путем десятикратного разведения первичной накопительной культуры и многократного (10 раз) последовательного пересева из последнего положительного разведения на среду Пфеннига, содержащую 20% CO₂ в газовой фазе в качестве единственного акцептора электронов. После десяти дней инкубации численность микробной популяции достигала 5×10⁶ клеток/мл и образовывалось до 0.5 мМ ацетата, а сидерит преобразовывался в серый осадок, идентифицированный методом Мёссбауэровской спектроскопии как фужерит (около 10%). Анализ разнообразия микроорганизмов в сообществе показал присутствие бактерий родов *Carboxydotherrmus* (69%), *Fervidobacterium* (11%), *Thermanaerotherix* (6%), *Thermodesulfovibrio* (4%), *Thermoanaerobaculum* и *Paludibaculum* (1%). По литературным данным большинство этих родов связаны с циклом железа.

7.2.2. Масштабирование эксперимента в анаэробном ферментере

Для изучения кинетики процесса биогеохимической трансформации сидерита полученной накопительной культурой был проведен эксперимент в настольном ферментере, заполненном 3 л стерильной среды с добавлением 300 г сидерита. Объемное соотношение между твердой, жидкой и газовой фазами в ферментере составляло примерно 1:9:2 (об/об). Ферментер работал в течение 56 дней в режиме медленного перемешивания. В процессе эксперимента через каждые 7 дней производился отбор проб для мониторинга микробного роста, образования ацетата и трансформации сидерита. Мёссбауэровский анализ показал, что в процессе трансформации гидротермального сидерита происходит линейное увеличение новой фазы, идентифицированной как новообразованный сидерит, спектральные характеристики которого отличались от исходного; также шло образование магнетита (Рис. 14, Табл. 8).

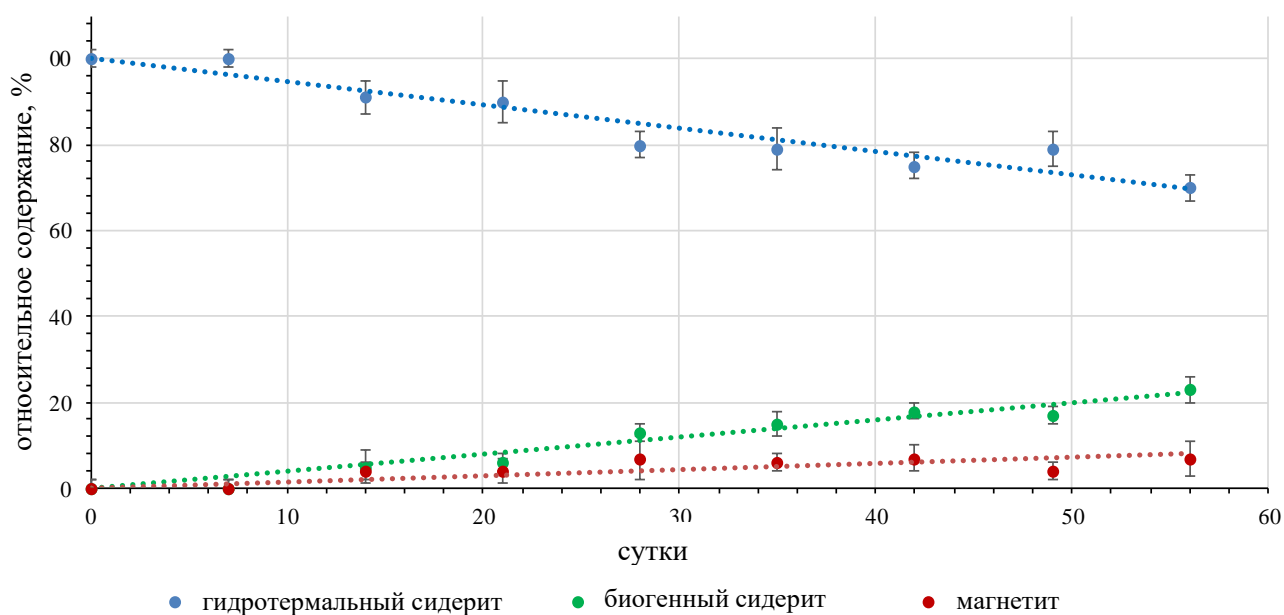


Рисунок 14. Изменение состава твердой минеральной фазы в ферментере под воздействием анаэробного термофильного сообщества течение инкубационного периода.

В конце эксперимента в осадке было обнаружено большое количество сферолитов сидерита со средним размером около 2-5 мкм и типичной морфологии, зафиксированной ранее в экспериментах с бинарной культурой *G. ferrihydriticus* и *A. alkalilacustris* (Рис. 15). Некоторые сферолиты формировались на поверхности частиц гидротермального сидерита (Рис. 15в). Также наблюдались наночастицы минералов, инкрустирующих бактериальные клетки (Рис. 15г). Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия показала, что элементный состав новообразованных сферолитов идентичен составу гидротермального сидерита, но обогащен фосфором, что подтверждало его биогенное происхождение. Анализ таксономического состава сообщества, начиная с 25-го дня инкубации и до конца эксперимента, показал существенное преобладание в ферментере бактерий рода *Thermanaerothrix*. 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, равно как и концентрация ацетата (Табл. 8). Общее содержание органического углерода в минеральных фазах, проанализированное методом пиролиза

Rock-Eval33 в конце инкубации, в опыте было в двадцать раз выше по сравнению с контролем (0.043 против 0.002 масс. %), что указывало на процесс активной ассимиляции углекислоты в процессе бактериального роста.

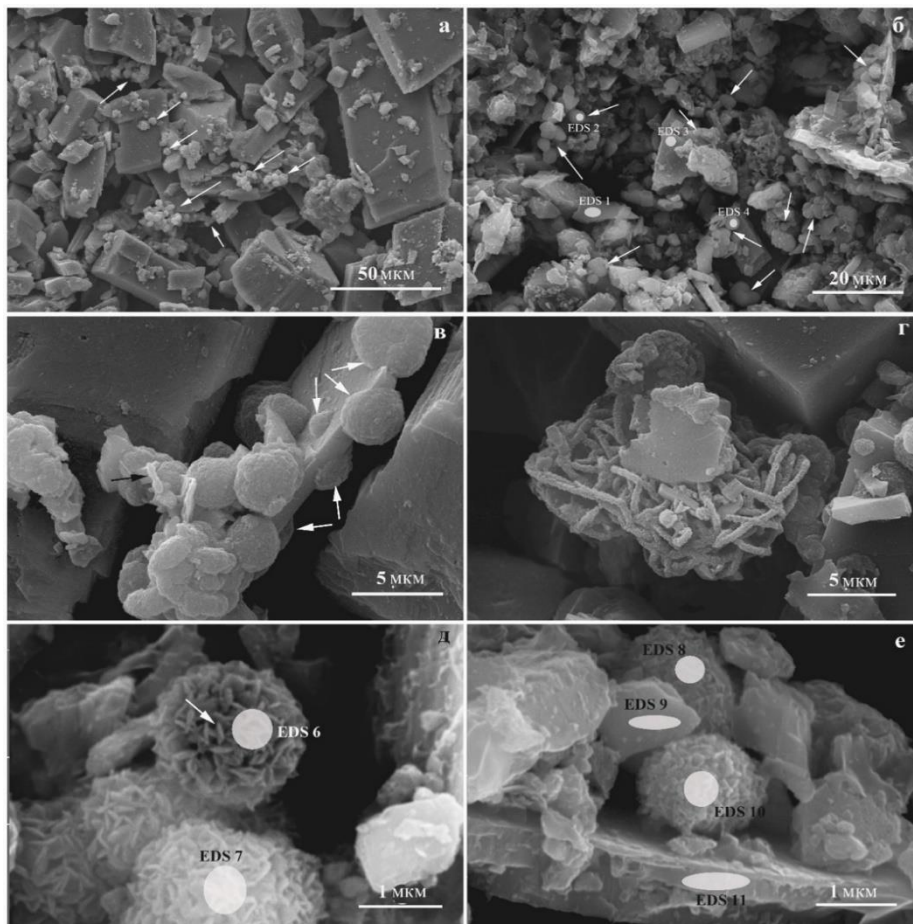


Рисунок 15. Микрофотографии минеральной фазы, отобранной из ферментера после окончания эксперимента: а, б - общий вид частиц гидротермального сидерита с новообразованными сферолитами биогенного сидерита (белые стрелки); белыми овалами указаны места EDS-анализа (Таблица 18 диссертации); в - сферолиты 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).

Показания Eh, измеренные в средней части ферментера во время инкубации, колебались в пределах от -7 до -109 мВ; в верхней части ферментера показания Eh соответствовали +30 мВ, указывая на существование оксиклина. Минеральный осадок, собранный с поверхности стенок ферментера и лопасти, показал, 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) ($10.6 \pm 0,5\%$). Проведенные термодинамические расчеты изменения свободной энергии Гиббса для условий эксперимента показали, что сидерит нестабилен и может быть окислен анаэробными термофилами посредством следующей реакции:

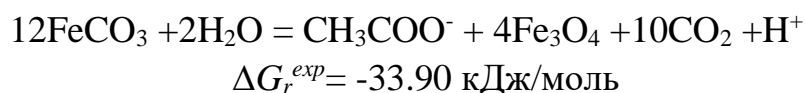


Таблица 8. Обобщенные микробиологические и минералогические параметры в ферментере за 56-дневный инкубационный период.

| сутки | численность, клетки/мл | филогенетический состав микробного сообщества, % | ацетат, мМ | состав минеральной фазы, % |
|-------|------------------------|---|------------|----------------------------|
| 0 | 3.0×10^5 | <i>Carboxydotherrnus</i> (69), <i>Fervidobacterium</i> (11), <i>Thermanaerotherix</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>Carboxydotherrnus</i> (5), <i>Fervidobacterium</i> (0.5), <i>Thermanaerotherix</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>Carboxydotherrnus</i> (0.1), <i>Fervidobacterium</i> (0.04), <i>Thermanaerotherix</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>Carboxydotherrnus</i> (0.3), <i>Fervidobacterium</i> (0.5), <i>Thermanaerotherix</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>Carboxydotherrnus</i> (0.2), <i>Fervidobacterium</i> (0.5), <i>Thermanaerotherix</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

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. 16), что 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 *Carboxydotherrnus*, *Thermodesulfovibrio*, *Thermoanaerobaculum* или *Paludibaculum*.

Сформировавшееся в ходе экспериментов высокоспециализированное анаэробное термофильное микробный сообщество было способно расти без аллохтонного органического вещества, используя энергию окисления сидерита, с CO_2 как акцептором электронов и образованием ацетата как восстановленного продукта. Ацетат и биомасса клеток служили донорами электронов для железоредукторов, что делало возможным восстановление образующегося магнетита. Выявленное циклическое преобразование сидерита приводило к накоплению органического вещества в виде малодоступного к

разложению керогена и смеси окисленных минералов железа, магнетита и вторично образовавшегося гематита (Рис. 17).

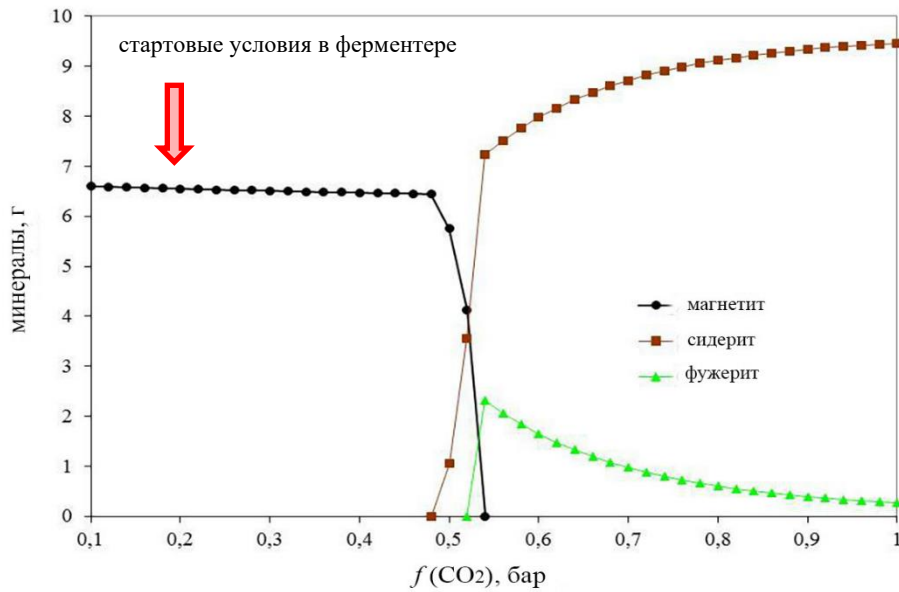


Рисунок 16. Термодинамические расчеты равновесных минеральных ассоциаций при $f(\text{CO}_2)$ от 0.1 до 1.0 бар, проведенные для экспериментальных условий. При начальной фугитивности CO_2 (0.2 бар) (стрелка) сидерит не является стабильным. При фугитивности углекислого газа более 0.52 бар сидерит снова становится стабильным.

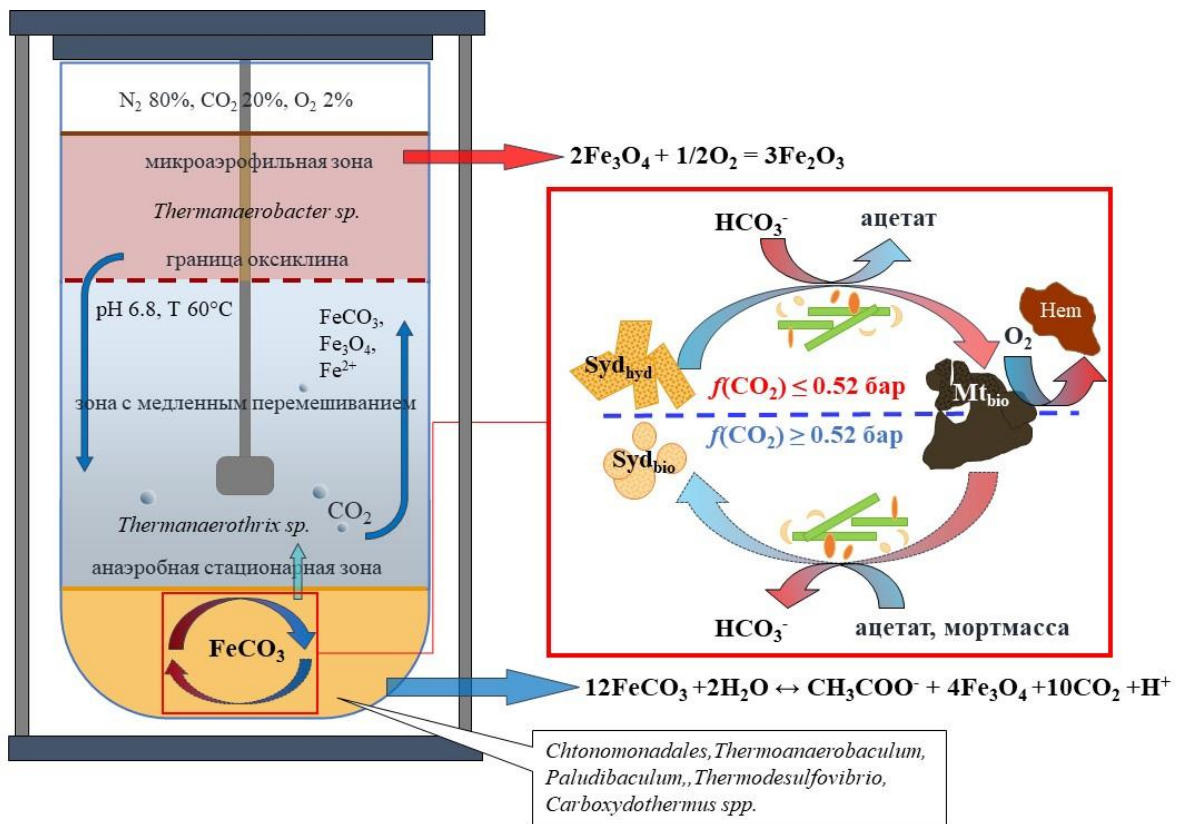


Рисунок 17. Схематическое изображение предлагаемых процессов в ферментере. Сокращения: Sid_{hyd} - гидротермальный сидерит; Sid_{bio} - биогенный сидерит; Mt_{bio} - биогенный магнетит; Hem - гематит; красный квадрат - анаэробный цикл железа, осуществляемый термофильным микробным сообществом на дне ферментера в минеральном осадке.

Такой независимый от света и кислорода биологически-индуцированный цикл железа мог служить основой биогеохимических преобразований в древней биосфере, подобно тому, как цикл углерода с основными реакциями окисления 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, происходящее 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 железистых кварцитов, имеющих первостепенное значение как основной источник железных руд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований удалось существенно расширить знания об анаэробных алкалофильных бактериях, населяющих содовые озера, и их участии в биогеохимическом цикле железа. 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 электронов. Способность выделенных бактерий восстанавливать также соединения серы (элементарную серу или тиосульфат) отражает их адаптацию к химическим условиям, существующим в анаэробных осадках современных содовых озер с доминированием круговорота серных соединений. В то же время проведенные нами эксперименты убедительно продемонстрировали, что исключение из щелочных минеральных сред сульфата и добавление минералов железа приводит к накоплению филогенетически разнообразных прокариот способных как к диссимиляционным процессам восстановления/окисления железа, так и к процессами облегченного брожения, при котором трехвалентное железо используется как акцептор для сбрасывания избыточных электронов. Таким образом, удалось показать, что ничтожная растворимость железа в щелочных условиях не является препятствием для использования этого элемента в реакциях хемосинтеза анаэробными прокариотами, как полагали ранее (Ye et al., 2004), 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 рН. В восстановительных условиях и $pH \geq 8.0$, характерных для анаэробных осадков содовых озер многие минералы железа находятся в метастабильном состоянии, и их устойчивость в этом случае обуславливается, прежде всего, кинетическими факторами. Такие условия оказываются благоприятными для вовлечения железосодержащих 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 (оксидов, 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 минералов железа в щелочных анаэробных карбонатных средах.

Проведенные эксперименты позволили выявить новый процесс анаэробного окисления закисного железа, с образованием ацетата в качестве восстановленного продукта осуществляемого *G. ferrihydriticus* и *D. alkaliphilus*, штамм Z-1002. В результате этого процесса как в чистой культуре *G. ferrihydriticus*, так и в составе бинарных культур, основанных на метабиотических или синтрофных взаимодействиях, происходило анаэробное окисление силикатов (биотит, глауконит), оксидов (магнетит) 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 протекания этого процесса. 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 механизмом этого процесса является прямое использование металлического железа в качестве донора электронов. В качестве акцепторов 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, так как при реакции бетона с водой происходит существенное защелачивание среды и, значит, создаются благоприятные условия для развития анаэробной алкалофильной микрофлоры.

Экспериментальные работы, проведенные как с алкалофильными, так и с термофильными микробными сообществами показали возможность 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. Удалось показать неизвестную ранее способность *Ectothiorodospira shaposhnikovii* использовать закисное железо в качестве донора электронов. Ацетогенная бактерия, представляющая собой новый род в семействе *Halanaerobiaceae*, и, по-видимому, развивающаяся за счет мортмассы фототрофа, существенно стимулировала его развитие за счет образования 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 (Weiss et al., 2016; Raymond et al., 2003).

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 сообществом, анаэробно окисляющим сидерит в автотрофных условиях. 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 (Catling and Zahnle, 2020). 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. 18).

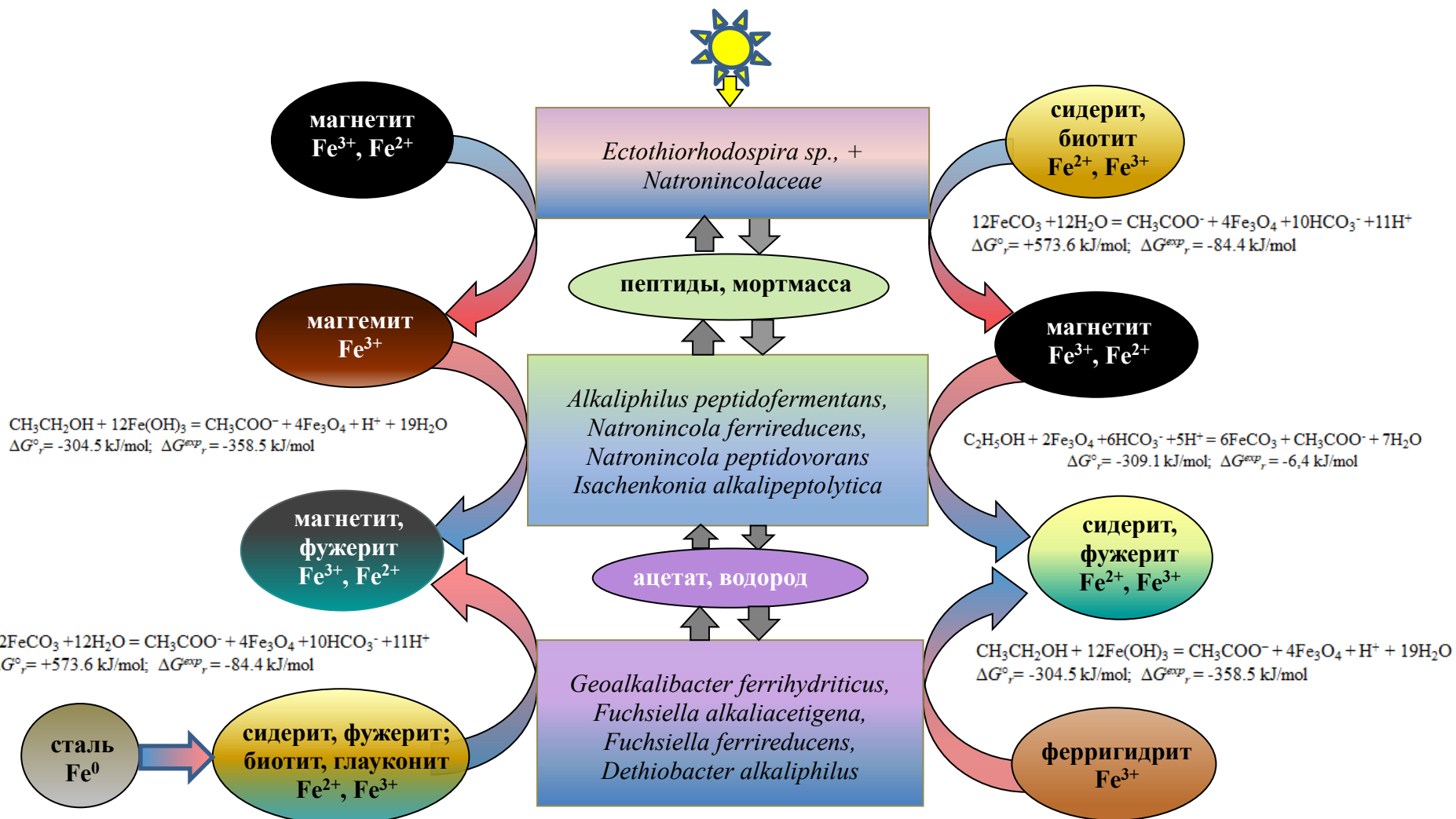


Рисунок 18. Схематическое обобщение, полученных экспериментальных данных, демонстрирующее взаимодействие акалофильных анаэробных бактерий из содовых озер с минералами железа.

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 отсутствии органики. Показано, что основным процессом, приводящим к разрушению стали в этих условиях и осуществляемым *Geoalkalibacter ferrireducens*, является

диссимиляционное окисление металлического железа в закисное с использованием протонов воды в качестве акцепторов электронов, которое сопровождается 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 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 peptid 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., **Заварзина Д.Г.** (2010). Исследования процессов образования минералов железа диссимиляторной 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. **Заварзина Д.Г.**, 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., **Заварзина Д.Г.** (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 B.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.S., Koksharov Yu.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Gavrillov 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.**, Gavrillov 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., Pikhtereva V.A., Rusakov V.S., Chistyakova N.I., Ziganshin R.H., Maslov A.A., Gavrillov 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. 14:1108245. DOI:10.3389/fmicb.2023.1108245.

Тезисы конференций

21. **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.
22. 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.
23. **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.
24. Чистякова Н. И., Русаков В. С., Назарова К. А., Шапкин А. А., **Заварзина Д. Г.**, Жилина Т.Н. Исследование процессов образования минералов железа диссимиляторными бактериями методами Мёссбауэровской спектроскопии // Тезисы XI Международная конференция “Мёссбауэровская спектроскопия и ее применение“. 2009. 1–5 июня, Екатеринбург, Россия, с. 142.
25. 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.
26. 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.
27. **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.
28. **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.
29. **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.
30. 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.
31. **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.
32. 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

33. **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.
34. 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.
35. **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.
36. 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.
37. 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.
38. Gracheva M.A., Chistyakova N.I., Antonova A.V., Trifonova V.K., Koksharov Yu A., Kiseleva T.Yu, **Zavarzina D.G.**, Gavrillov 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.
39. **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.
40. **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.
41. **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 алкалофильных анаэробных бактерий // Тезисы Конференции «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний». 2023. 3–7 июля, Улан-Удэ Россия, с. 43.