

УДК 579.26+579.083.1

АЛКАЛОТЕРМОФИЛЬНЫЕ ЖЕЛЕЗОРЕДУЦИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ ГОРЯЧИНСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ ТЕРМАЛЬНЫХ ВОД¹

© 2024 г. Д. Г. Заварзина^{а, *}, А. А. Ключкина^а, А. Ю. Меркель^а, Т. А. Маслова^б, А. А. Маслов^с

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 117314, Россия

^бФакультет химической технологии и экологии РГУ нефти и газа имени И.М. Губкина, Москва, 119991, Россия

^сГеологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия

*e-mail: zavarzinatwo@mail.ru

Поступила в редакцию 30.05.2024 г.

После доработки 25.06.2024 г.

Принята к публикации 03.07.2024 г.

Исследование метаболической группы железоредуцирующих прокариот, использующей слабокристаллический минерал ферригидрит в качестве акцептора электронов, выявило ее широкое распространение на Земле. Тем не менее способность железоредукторов развиваться в полиэкстремальных условиях — при повышенных значениях pH и температурах до сих пор показана не была. Для доказательства существования алкалотермофильных железоредукторов нами были исследованы пробы воды и осадков азотных терм Горячинска. Эти источники приурочены к молодым тектоническим разломам Байкальской рифтовой зоны, и их воды характеризуются низкой минерализацией, высокими значениями pH (8.8–9.2) и температуры (53–55°C). При добавлении синтезированного ферригидрита к пробам воды и донных отложений Горячинских терм и их инкубации в анаэробных условиях при температурах 50 и 55°C были получены накопительные культуры, восстанавливающие этот минерал. Профилирование проб воды и осадков и первичных накопительных культур по гену 16S rPНК выявило их высокое филогенетическое разнообразие, представленное почти исключительно бактериальными таксонами. Дальнейшие пересевы с ферригидритом и органическими кислотами или водородом, добавленными в качестве донора электронов, позволили получить устойчивые накопительные культуры органо- и литотрофных алкалотермофильных железоредукторов. От 30 до 50% общей представленности в них составляли представители рода *Parvivirga* — одного из первых культивируемых представителей группы OPB41 (ныне порядок *Anaerosomatales*) филума *Actinomycetota*.

Ключевые слова: экстремофильные прокариоты, алкалотермофильные железоредукторы, подземная биосфера, гидротермы, Байкал, *Parvivirga*

DOI: 10.31857/S0026365624060124

Процесс анаэробной железоредукции, осуществляемой микроорганизмами, использующими для получения энергии минералы трехвалентного железа, например, ферригидрит, интенсивно исследуется с 80-х годов прошлого века. На сегодняшний день известно более 150 видов прокариот, способных к дисимбиотическому восстановлению железа, относящихся как к домену Bacteria, так и Archaea (Nixon et al., 2022). Подавляющее большинство железоредукторов — бактерии, представители более чем 20 семейств, что доказывает их высокое филогенетическое разнообразие (Waite et al., 2020; Li et al., 2021; Khomyakova et al., 2022a, 2022b; Nixon et al., 2022; Khomyakova et al., 2022b; Zavarzina et al., 2022;

Zhang et al., 2022; Han et al., 2023; Zakharyuk et al., 2023; Boltyanskaya et al., 2023). Описанные на сегодняшний день железовосстанавливающие микроорганизмы выделены из разнообразных эконш, включая анаэробные илы пресноводного и морского происхождения, болота, антропогенные местообитания, такие как метантенки и топливные элементы, а также подземные экосистемы. Наибольшее число видов выделено из морских и пресноводных осадков, морских и наземных гидротермальных систем и почв (Nixon et al., 2022). Большинство известных железоредукторов — мезофилы, имеющие оптимум роста при температурах 25–35°C и значениях pH 6.5–7.5. Однако примерно 40% описанных видов

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: <https://doi.org/10.31857/S0026365624060124>

железоредукторов выделено из экстремальных мест обитания: известны термофильные, психрофильные, ацидофильные и алкалофильные представители этой метаболической группы (Nixon et al., 2022). Анализ распределения 141 вида железоредукторов в координатах pH и T, проведенный Nixon и соавт., выявил несколько интересных закономерностей: несмотря на то, что термодинамические расчеты показывают возможность существования полиэкстремофильных железоредукторов, описанные на сегодняшний день микроорганизмы либо относятся к “нормальной” микрофлоре, либо приспособлены к экстремальным условиям только по одному из исследованных параметров — pH или T. По мнению авторов исследования, такое распределение во многом является следствием предвзятости пробоотбора и существенно искажает реальную картину распространенности процессов железоредукции на Земле. Исправить ситуацию могло бы, с одной стороны, привлечение к анализу данных метагеномных исследований и высокопроизводительного секвенирования гипервариабельных участков генов 16S рРНК, с другой стороны, целенаправленное выделение в чистые культуры полиэкстремофильных железоредукторов, которое могло бы разрешить вопрос о возможности их существования или выявило бы биохимические или кинетические ограничения, препятствующие их развитию (Nixon et al., 2022).

Примером таких полиэкстремальных экосистем являются щелочные гидротермы Байкальской рифтовой зоны, в частности, Горячинское месторождение подземных вод, расположенное на восточном берегу озера Байкал, приуроченное к Кики-Туринской зоне разломов. Эта значительная по ширине и протяженности тектонически ослабленная зона была заложена в протерозое, функционирует до настоящего времени и является юго-восточной границей Байкальской рифтовой системы, сложенной кристаллическими магматическими (граниты) и метаморфическими (гнейсы, гнейсограниты) породами (Ломоносов, 1974). Разломы и сопровождающие их зоны интенсивной трещиноватости формируют емкостную среду, вмещающую значительную часть естественных ресурсов трещинных вод этого района (Плюсин и соавт., 2013). Термальные воды Горячинского месторождения представляют собой типичные напорные трещинные воды, поднимающиеся с глубины порядка 1500–1800 м. По химическому составу они относятся к слабоминерализованным азотным щелочным термам. Температура воды на выходе составляет 53–55°C, дебит 1200 м³/сут, pH 8.8–9.2 (Ясницкая, Ткачук, 1961). Термальные щелочные воды этого месторождения образовались за счет взаимодействия метеорных вод с железосодержащими магматическими, метаморфическими и осадочными породами, подвергшимися дроблению и деформации в результате тектонических движений регионального масштаба, что привело к образованию

многочисленных трещин (Плюсин и соавт., 2013), которые могут потенциально служить местобитаниями для подземной микрофлоры.

Таким образом, Горячинские термы представляют собой безусловный интерес в качестве объекта для целенаправленного поиска и выделения полиэкстремофильных железоредукторов, что и являлось целью настоящих исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб. Скважина 1/76, пробуренная в 1963 году на глубину 100 м, вскрывает трещинные сульфатно-натриевые воды с минерализацией 54.2 мг/л, pH 8.9, температурой 54°C в отложениях баргузинского интрузивного комплекса, представленного сильно раздробленными амфиболитовыми и гнейсо-плагиогранитными брекчиями, в интервале 30–100 м (Ясницкая, Ткачук, 1961). Оголовок скважины находится в бетонном колодце, над которым построено надкаптажное деревянное сооружение (рис. S1a). За время эксплуатации скважины у основания колодца образовались грифоны, выходящие на поверхность и образующие ручей, впадающий в пруд, сформировавшийся разгружающимися подземными водами в 150 м западнее скважины. Проба № 1 (E 108°18'26.03", N 52°59'13.93") представляла собой песчаный и каменистый грунт и воду ручья, отобранные у самого основания бетонного колодца. Проба № 2 (E 108°18'27.97", N 52°59'14.04") была отобрана в 40 м ниже по течению ручья, образованного грифонами скважины 1/76 и термальным самоизливающимся источником, каптированным колодцем, расположенным в 20 м севернее скважины 1/76. Проба представляла собой илистые осадки, содержащие остатки прибрежной растительности и воду, отобранные с поверхности донных отложений ручья (рис. S1б). Проба № 3 представляла собой восстановленные илистые отложения, грунт и воду, отобранные там же с глубины 10 см (pH 8.8, T 50°C). Пробы вносили в стерильные стеклянные флаконы объемом 50 мл, содержащие синтезированный ферригидрит (расчетная конечная суммарная концентрация трехвалентного железа 45 мМ), приготовленный, как описано ранее (Zavarzina et al., 2006), и полностью заполняли водой, отобранной из места отбора проб для поддержания анаэробных условий. Для пробы № 1 было поставлено три варианта: (1) без добавления дополнительных доноров; (2) с добавлением смеси органических кислот — формиат, ацетат, лактат и пируват (по 0.5 г/л каждого); (3) с добавлением дрожжевого экстракта (1 г/л). В пробы № 2 и 3, богатые органическим веществом, дополнительные доноры не вносили. В лаборатории перед инкубацией

из каждого флакона было вытеснено 30 мл воды азотом. Продувку газом осуществляли в ламинаре через мембранный фильтр (0.22 мкм). Инкубацию проводили в темноте в течение 10 сут при T 55°C (проба № 1) и 50°C (пробы № 2 и 3).

Выделение ДНК, подготовка и секвенирование библиотек ампликонов гена 16S рРНК. ДНК выделяли из осадков, отобранных в 5 мл стерильные пластиковые флаконы, параллельно с пробами для инкубации. Также ДНК выделяли из осадков и воды первичных накопительных культур, в которых было зафиксировано восстановление ферригидрита, и полученных в ходе дальнейших пересевов накопительных культур органо- и литотрофных алкалотермофильных железоредукторов. Для этого флаконы встряхивали и шприцем анаэробно отбирали по 5 мл суспензии, которую затем центрифугировали при 13000 об./мин в течение 20 мин при 4°C. Полученную надосадочную жидкость сливали, а осадки использовали для экстракции тотальной ДНК. ДНК выделяли при помощи набора FastDNA™ SPIN Kit for Soil ("MP Biomedicals", США), согласно инструкции производителя.

Подготовку библиотек ампликонов V4 участка гена 16S рРНК проводили по описанной ранее методике (Gohl et al., 2016) с использованием пары праймеров 515F (5'-GTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3'; Hugerth et al., 2014) — Pro-mod-805R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'; Меркель и соавт., 2019). Секвенирование библиотек проводили на системе MiSeq™ ("Illumina Inc.", США) с использованием картриджа для получения парно-концевых прочтений длиной 150 нуклеотидов. Биоинформатический анализ проводили аналогично описанному в работе (Merkel et al., 2021). Все данные секвенирования депонированы в NCBI BioProject PRJNA1117896.

Получение накопительных культур. В качестве посевного материала для получения накопительных культур алкалотермофильных железоредукторов использовали пробы (5% засев) из флаконов с первичными накопительными культурами, проявившими способность к железоредукции, визуально определяемой по потемнению осадка ферригидрита. В качестве минеральной основы использовали среду, приготовленную с соблюдением техники анаэробного культивирования под N_2 (100%), следующего состава (г/л): 0.15 KH_2PO_4 ; 0.15 NH_4Cl ; 0.15 KCl ; 0.15 $MgCl_2 \cdot 2H_2O$; 0.15 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; Na_2CO_3 0.3; растворы витаминов (1 мл/л) (Wolin et al., 1963) и микроэлементов (1 мл/л) (Кевбрин, Заварзин 1992); pH подводили до значения 9.0 10% раствором NaOH. Разлив осуществляли в пробирки Хангейта по 10 или 5 мл под током N_2 (100%). В качестве доноров электронов для накопительных культур использовали смесь органических кислот, отдельные органические кислоты (формиат, ацетат, лактат или пируват по 1 г/л) или

молекулярный водород (20% от газовой фазы). Инкубацию проводили при 55°C.

Состояние накопительных культур контролировали по изменению численности прямым подсчетом клеток, окрашенных красителем акридиновым оранжевым, с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Lab.A1 ("Carl Zeiss", Германия) и образованию двухвалентного железа, определенного спектрометрически с феррозином (Stookey, 1970).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Восстановление ферригидрита в первичных накопительных культурах алкалотермофильных железоредукторов

Изменение цвета осадка ферригидрита было зафиксировано через 10 сут после начала инкубации во всех пробах, за исключением пробы № 1 без добавления дополнительных доноров. Качественные характеристики осадка (цвет, магнитность), результаты измерения двухвалентного железа, растворимого в 6N HCl, pH и подсчета клеток суммированы в табл. 1. Морфологически в первичных накопительных культурах преобладали палочки разной длины, споровые и неспоровые, преимущественно неподвижные, и вибрионы (дополнительные материалы, рис. S2).

Филогенетический состав микробного сообщества проб воды и осадка и первичных накопительных культур, восстанавливающих ферригидрит

Проба № 1. Микробное сообщество пробы, отобранной в месте разгрузки грифона скважины 1/76, на уровне филумов характеризовалось достаточно высоким разнообразием. Основную часть сообщества (42%) составляли некультивируемые представители филума *Pseudomonadota* (синоним *Proteobacteria*), второе по распространенности место (14.7%) занимали представители *Nitrospirota*, третье (10.5%) представители филума *Deinococcota* (рис. 1).

При этом представленность большинства бактериальных таксонов на уровне семейств—родов (менее 3%) (рис. 2, табл. S1), а большинство филотипов имело низкое сходство с известными таксонами, что значительно затруднило интерпретацию их метаболических возможностей. Из известных таксонов заметную часть сообщества составлял филотип, относящийся к роду *Meiothermus* (10.5% представленности).

Представители этого рода — термофильные азобные сахаролитики, способные также к нитратредукции, являются типичной микрофлорой термальных источников, в частности, щелочных гидротерм Буриятии, но обнаружены и в восстановительных

Таблица 1. Основные характеристики процесса восстановления ферригидрита первичными накопительными культурами алкалотермофильных железоредукторов

Проба	T _{инкуб.} , °C	pH после инкубации	Цвет осадка	Магнитность осадка	Fe(II), mM	Количество клеток, кл./мл
№ 1	55	8.9	Коричневый	Не магнитный	0.2	7.3×10^5
№ 1 + органические кислоты	55	8.49	Черный	Сильно магнитный	3.75	2.9×10^7
№ 1 + дрожжевой экстракт	55	8.16	Черный	Слабо магнитный	9.31	3.4×10^7
№ 2	50	7.88	Темно-коричневый	Не магнитный	4.75	6.9×10^7
№ 3	50	8.0	Черный	Слабо магнитный	4.38	1.1×10^8
Контроль*	55	8.9	Коричневый	Не магнитный	0	Не обнаружено

*В качестве контроля использовали флакон с ферригидритом и пробами донных осадков и воды источника Горячинск, перед инкубацией подвергшийся стерилизации при 1 атм и 120°C.

условиях подземных водоносных горизонтов (Будагаева, Бархутова, 2015; Raposo et al., 2019; Лукина и соавт., 2023).

Проба №1/ферригидрит/органические кислоты. При добавлении в качестве акцептора электронов синтезированного ферригидрита и смеси органических кислот в качестве доноров электронов состав микробного сообщества существенно изменился. На уровне филумов уменьшилась доля представителей *Pseudomonadota* и *Nitrospirota*, за счет увеличения доли представителей *Bacillota* (синоним *Firmicutes*), Sva0485 и *Actinomycetota* (рис. 1). На уровне семейств—родов основу первичной накопительной культуры составляли филотипы, близкие к родам *Desulfotomaculum* (21.1% представленности), *Meiothermus* (12.3%) и некультивируемым представителям филума Sva0485 (14.7%) (рис. 2, табл. S1). Способность к органотрофной железоредукции показана для некоторых видов рода *Desulfotomaculum*, например, *D. reducens* MI-1 (Otwell et al., 2018). Представители некультивируемой группы Sva0485 были впервые обнаружены в биопленках шахты Ричмонд (Bond et al., 2020) и описаны как потенциальные восстановители сульфата или окисного железа. С тех пор многочисленные исследования подтвердили присутствие бактерий клады Sva0485 (относительная численность $\geq 5\%$) в кислых экосистемах, связанных с разработкой сульфидных руд (включая воду, осадки и биопленки) (Tan et al., 2019). В некоторых случаях численность этой группы достигала более 50% сообщества, как в случае осадков, отобранных в горе Сян (Китай) (Hao et al., 2007). Предпринятая недавно реконструкция четырех композитных геномов представителей этой клады, полученных из осадков шахтных вод нескольких разработок юго-восточного

Китая, позволила реконструировать их метаболизм на основе геномных данных и выделить их в новый порядок в статусе *Candidatus* внутри группы Sva0485 — *Ca. Acidulodesulfobacterales* (Tan et al., 2019). Согласно проведенному анализу геномов, представители этого порядка являются ацидофильными факультативно анаэробными автотрофами, которые, вероятно, используют кислород в качестве акцептора электронов и Fe(II) или сульфиды в качестве донора электронов при развитии в кислородсодержащих средах сульфидных месторождений — шахтных водах и на поверхности биопленки. В то же время они могут осуществлять диссимиляционное восстановление сульфатов или Fe(III) и брожение в анаэробных условиях внутри биопленок и осадков (Tan et al., 2019). Следует отметить, что помимо кислых экосистем, эта группа была обнаружена также в конкрециях гидроксидов железа из четвертичных отложений Японии (представленность 9.4%), неактивном глубоководном черном курильщике (представленность 12.3–13.8%) и железистых осадках из пресноводного озера Товути (Индонезия) (представленность ~2–20%) (Yoshida et al., 2008; Sylvan et al., 2012; Vuillemin et al., 2018), т.е. в экосистемах с нейтральными или слабощелочными условиями. Представители этой группы, но с низким (88%) уровнем идентичности, согласно анализу BLAST были идентифицированы нами в зоне питания верхнемелового водоносного горизонта Ессентукского месторождения минеральных вод. Вскрываемые воды этого участка — пресные, карбонатно-натриевого типа, теплые, окисигенированные, характеризуются повышенными значениями pH 8.5 (Zavarzina et al., в печати). Существенное накопление (до 14.7%) представителей этой группы в микрокосме с ферригидритом



Рис. 1. Таксономическое разнообразие микроорганизмов, ассоциированных с природными пробами № 1, 2 и 3 и накопительными культурами на уровне филумов.

и органическими кислотами, по сравнению с исходной пробой (ниже пределов обнаружения метода), не только подтверждает высказанные ранее предположения о метаболических особенностях этой глубокой ветви бактерий, связанных с преобразованием минералов железа, но и существенно расширяет представления об их экологии.

Проба №1/ферригидрит/дрожжевой экстракт.

При добавлении в качестве акцептора электронов синтезированного ферригидрита и донора электронов дрожжевого экстракта на уровне филумов еще больше возрасла доля представителей *Bacillota*, а вместо филума Sva0485 преимущество получили филотипы, относящиеся к филуму *Thermotogota*

(рис. 1). На более низком таксономическом уровне было зафиксировано накопление филотипов, относящихся к родам *Fervidobacterium* (14.0% представленности), *Thermincola* (11.0%) и *Desulfurispora* (8.1%) (рис. 2, табл. S1), хотя в целом сообщество отличалось высоким таксономическим разнообразием и состояло из 25 родов, представленность которых составила не менее 1%. Накопление представителей вышеуказанных родов по сравнению с исходной пробой, где они не были зафиксированы, было отмечено и в микрососме с ферригидритом и органическими кислотами, однако там их представленность составляла не более 2% (рис. 2, табл. S1). Представители рода *Fervidobacterium* являются облигатными

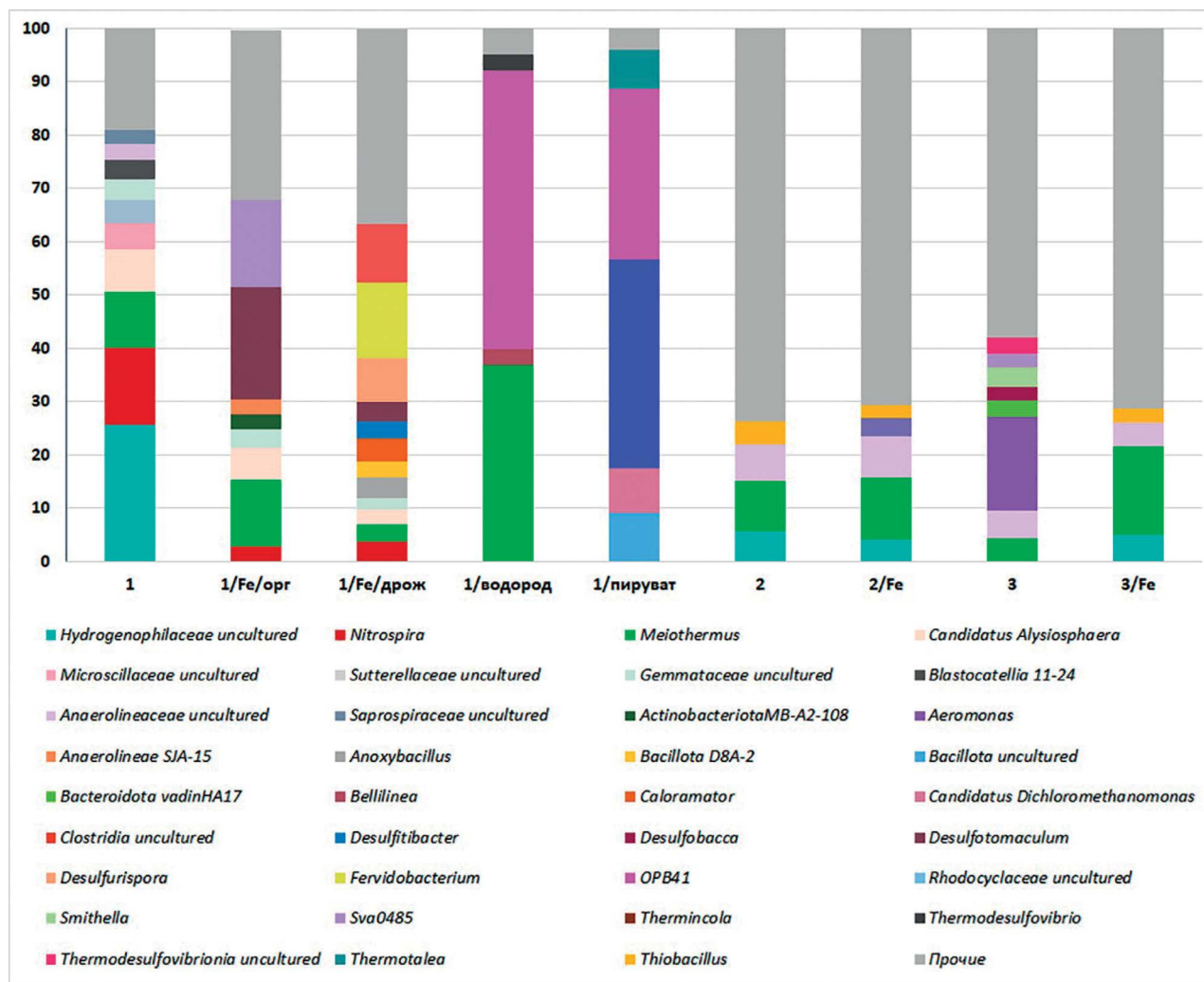


Рис. 2. Таксономическое разнообразие микроорганизмов на уровне родов, ассоциированных с пробами и накопительными культурами Горячинского месторождения подземных вод. Условные обозначения: 1 – проба № 1; 1/Fe/орг – первичная накопительная культура, полученная при добавлении ферригидрита и смеси органических кислот; 1/Fe/дрож – первичная накопительная культура, полученная при добавлении ферригидрита и дрожжевого экстракта; 1/водород – накопительная культура диссимиляционных алкалоотермофильных железоредукторов, с водородом как донором электронов; 1/пируват – накопительная культура диссимиляционных алкалоотермофильных железоредукторов, с пируватом как донором электронов; 2 – проба № 2; 2/Fe – первичная накопительная культура, полученная при добавлении ферригидрита; 3 – проба № 3; 3/Fe – первичная накопительная культура, полученная при добавлении ферригидрита.

анаэробами-органотрофами, использующими широкий спектр сахаров, полисахаридов и пептидов, в частности, дрожжевой экстракт, встречающиеся в местообитаниях, связанных с наземной вулканической активностью, характеризующихся температурами около 65°C и низкой соленостью (Podosokorskaya et al., 2011). Интересно, что все без исключения представители этого рода способны к облегченному восстановлению элементной серы, а для наиболее филогенетически близких к ним представителей рода *Thermosypho* была показана способность к облегченному брожению за счет восстановления соединений Fe(III) (Chen et al., 2021).

Хемоорганотрофные представители рода *Thermincola* широко распространены в различных экосистемах, и их метаболизм основан, в том числе, на железоредукции с использованием органических кислот, например, ацетата в качестве донора электронов (Zavarzina et al., 2007; Byrne-Bailey, 2010), кроме того, доказана их способность к электрогенезу (Marshall, May, 2009). Единственный известный на сегодняшний день представитель рода *Desulfurispora* – анаэробная термофильная бактерия, способная к восстановлению различных серных соединений, но не к железоредукции с использованием в качестве

донора электронов водорода, органических кислот, спиртов и некоторых сахаров (Kaksonen et al., 2007). Однако есть сообщения о накоплении представителей этого рода при восстановлении железосодержащих минералов — шверцманита и ярозита, осаждающихся на геохимическом барьере при смешении кислых вод с нейтральными в сульфидных месторождениях (Bao et al., 2018). Таким образом, в первичной накопительной культуре с добавлением дрожжевого экстракта в качестве дополнительного донора электронов преимущество получили термофильные анаэробные микроорганизмы, способные к анаэробному брожению и, возможно, использующие минералы трехвалентного железа для сброса избыточных электронов, а также хемоорганотрофные бактерии, использующие органические кислоты, прежде всего, ацетат, а также молекулярный водород, накапливающиеся при разложении сложных органических веществ, в качестве доноров электронов при железоредукции и способные к активному росту в условиях повышенных значений pH.

Проба № 2. Микробное сообщество пробы, отобранной с поверхности илистых осадков в 50 м ниже по течению ручья, образованного при каптаже скважины 1/76, отличалось большим по сравнению с пробой № 1 таксономическим разнообразием, и на уровне филумов (рис. 1), и на уровне семейств—родов (рис. 2, табл. S1) преимущественно бактериальных таксонов. Археи в пробе составляли не более 0.1%. Также, как и в пробе № 1, в сообществе доминировали представители филума *Pseudomonadota* (28.6%), однако уменьшилась доля представителей филумов *Nitrospirota* (2.2%) и *Acidobacteriota* (2.7%), но увеличилась доля представителей филумов *Chloroflexota* (12.9%). Существенную долю в сообществе пробы № 2 составляли филотипы, относящиеся к филуму *Desulfobacterota* (11.0%), не обнаруженные в пробе № 1. Интересным оказался тот факт, что добавление к пробе воды и ила синтезированного ферригидрита с последующей инкубацией в течение 10 сут при 50°C практически не оказало влияния на исходный состав сообщества (вторая цифра в перечислении филумов ниже). На уровне филумов сообщества пробы № 2 и первичной накопительной культуры с ферригидритом были представлены: *Nitrospirota* (2.2–2.4%), *Pseudomonadota* (28.6–26.9%), *Actinomycetota* (2.9–7.6%), *Deinococcota* (9.6–11.7%), *Acidobacteriota* (2.7–4.6%), *Chloroflexota* (12.9–17.2%), *Bacteroidota* (8.7–5.7%), *Desulfobacterota* (11.0–8.0%), Sva0485 (0.8–2.0%), *Planctomycetota* (2.8–3.3%), *Verrucomicrobiota* (2.9–1.3%), *Cyanobacteria* (4.6–1.0%) (рис. 1).

На более низком таксономическом уровне наиболее многочисленными в микробном составе исходной пробы и первичной накопительной культуры были филотипы, относящиеся к роду

Meiothermus (9.5–11.6%) и некультивируемым представителям семейств *Anaerolineaceae* (7.0–7.9%) и *Hydrogenophilaceae* (5.6–4.1%) (рис. 2, табл. S1). Сообщества также отличались высоким таксономическим разнообразием и состояли из 19 (проба № 2) и 24 (первичная накопительная культура) родов, представленность которых составила не менее 1.0%. При этом прочие минорные таксоны, относительная представленность которых была менее 1.0%, составили 48.6 и 38.3% микробного состава пробы № 2 и первичной накопительной культуры соответственно. Таким образом, можно предположить, что микробное сообщество илистых отложений в месте отбора пробы № 2 в большой степени состоит из органотрофов, и добавление ферригидрита не оказало на них существенного влияния, поскольку внесенный ил содержал достаточное количество органики, а ферригидрит, вероятно, восстанавливался преимущественно за счет облегченного брожения, при сбросе избыточных электронов.

Проба № 3. Микробное сообщество пробы, отобранной с глубины 10 см (восстановленный слой), также отличалось исключительно высоким биоразнообразием, но в целом имело большое сходство с пробой № 2 (рис. 1, 2, табл. S1). В этом случае добавление к пробе воды и ила синтезированного ферригидрита и инкубация в течение 10 сут при 50°C существенно сказались на максимально представленном в исходной пробе филотипе. Бактерии, относящиеся к роду *Aeromonas* (17% представленности в пробе № 3) в первичной накопительной культуре полностью элиминировались. Их заменили бактерии, близкие к роду *Meiothermus* (4.3–16.6%). На уровне филумов микробный состав исходной пробы № 3 и накопительной культуры с ферригидритом были представлены: *Nitrospirota* (3.1–2.8%), *Pseudomonadota* (26.6–25.9%), *Actinomycetota* (3.9–6.3%), *Deinococcota* (4.3–16.6%), *Acidobacteriota* (1.9–4.3%), *Chloroflexota* (16.2–15.4%), *Bacteroidota* (8.7–4.7%), *Desulfobacterota* (14.0–8.5%), Sva0485 (2.7–1.0%), *Planctomycetota* (2.7–3.7%), TA06 (1.9–0.1%) (рис. 1).

Получение накопительных культур диссимилиационных алкалотермофильных железоредакторов

Для получения накопительных культур диссимилиационных алкалотермофильных железоредукторов была использована первичная накопительная культура пробы № 1 с добавлением в качестве дополнительных доноров электронов смеси органических кислот, поскольку в данном случае повышалась вероятность накопления микроорганизмов, способных к диссимилиационной железоредукции. Первичная накопительная культура была пересеяна на анаэробную среду (pH 9.0) с ферригидритом

в качестве акцептора электронов и молекулярным водородом (10%, об.), формиатом, ацетатом, лактатом или пируватом, добавленных в концентрации 1 г/л, в качестве донора электронов. После 7 сут инкубации при 55°C были отобраны пробы для определения образовавшегося двухвалентного железа, измерения pH, морфологии преобладающих клеток (табл. 2).

Оценка филогенетического состава была проведена для накопительных культур, с наиболее интенсивным восстановлением ферригидрита (пируват) и с молекулярным водородом, в случае которого было возможно развитие автотрофных диссимилиационных железоредукторов. Результаты профилирования полученных сообществ по гену 16S рРНК выявили существенное сокращение микробного разнообразия в полученных накопительных культурах (рис. 1, 2, табл. S1).

В накопительной культуре с пируватом в качестве донора электронов 95.9% сообщества составляли 5 филотипов, четыре из которых относились к филуму *Bacillota* (рис. 2, табл. S1). Представители рода *Clostridium* составляли 39.2% сообщества и были наиболее близки к *Petroclostridium xylanilyticum* и некультивируемым представителям *Desulfotomaculum* sp. со сходством 99.63%. Поскольку *P. xylanilyticum* — типичная анаэробная органотрофная бактерия, разлагающая ксилан и не способная к железоредукции (Zhang et al., 2018), вероятнее всего обнаруженный филотип является представителем рода *Desulfotomaculum*. Этот род грамположительных органотрофных бактерий, для которых была показана способность не только к сульфатредукции, но и восстановлению металлов, в частности железа. Например, *D. reducens* MI-1 способен к восстановлению растворимых соединений окисного железа, а также нерастворимых оксидов и гидроксидов за счет облегченного сбраживания

пирувата (Dalla Vecchia et al., 2014). Неожиданным стало накопление в пробе филотипа, относящегося к группе OPB41, — до недавнего времени некультивируемых представителей филума *Actinomycetota* (синоним *Actinobacteriota*). Первые культивируемые бактерии этой группы, представляющие два новых рода в новом порядке *Anaerosomatales* и семействе *Anaerosomataceae* — *Anaerosoma tenue* и *Parvivirga hydrogeniphila* были выделены недавно из грязевых вулканов Тамани и водоносного горизонта Ессентукского месторождения минеральных вод (Khomyakova et al., 2022). Филотип, составляющий в накопительной культуре с пируватом 32% прочтений, имел сходство 99.6% с *P. hydrogeniphila*, т.е., скорее всего, являлся штаммом этого вида или новым видом (Yarza et al., 2014).

P. hydrogeniphila является термофильным анаэробом и облигатным автотрофным железоредуктором, использующим в качестве доноров электрона только молекулярный водород или формиат. Несмотря на то, что клетки этого филотипа имеют схожую морфологию и тенденцию к образованию колоний на минеральных частицах (рис. 3), характерные для *P. hydrogeniphila*, типовой штамм этого вида не способен развиваться при значениях pH выше 8.5 (Khomyakova et al., 2022).

Филотип, близкий к роду *Thermotalea*, составлял в накопительной культуре 7.2% прочтений. Единственный представитель рода — *Thermotalea metallivorans* — анаэробная органотрофная бактерия, способная восстанавливать гидроксиды железа и марганца (Ogg et al., 2009). Два остальных филотипа, составлявшие 9.1 и 8.4% прочтений, относились к глубокой некультивируемой ветви *Bacillota* и некультивируемому роду *Dichloromethanomonas* в статусе *Candidatus*, представители которого, как предполагается, способны к анаэробному разложению дихлорметана (Kleindienst et al., 2017).

Таблица 2. Основные характеристики процесса восстановления ферригидрита накопительными культурами алкалотермофильных железоредукторов, полученных из пробы № 1 после инкубации при 55°C

Донор	pH после инкубации	Цвет осадка	Магнитность осадка	Fe(II), mM	Морфология преобладающих клеток
Молекулярный водород	8.88	Темно-коричневый	Магнитный	5.71	Короткие палочки, образующие плотные колонии на частицах минералов
Формиат	8.8	Темно-коричневый	Не магнитный	1.34	Короткие палочки, образующие плотные колонии на частицах минералов
Ацетат	8.67	Темно-коричневый	Сильно магнитный	4.38	Вибрионы и длинные палочки
Лактат	8.57	Черный	Сильно магнитный	6.53	Вибрионы и длинные палочки
Пируват	7.94	Черный	Сильно магнитный	6.98	Вибрионы и длинные палочки
Контроль	8.9	Коричневый	Не магнитный	0	Не обнаружено

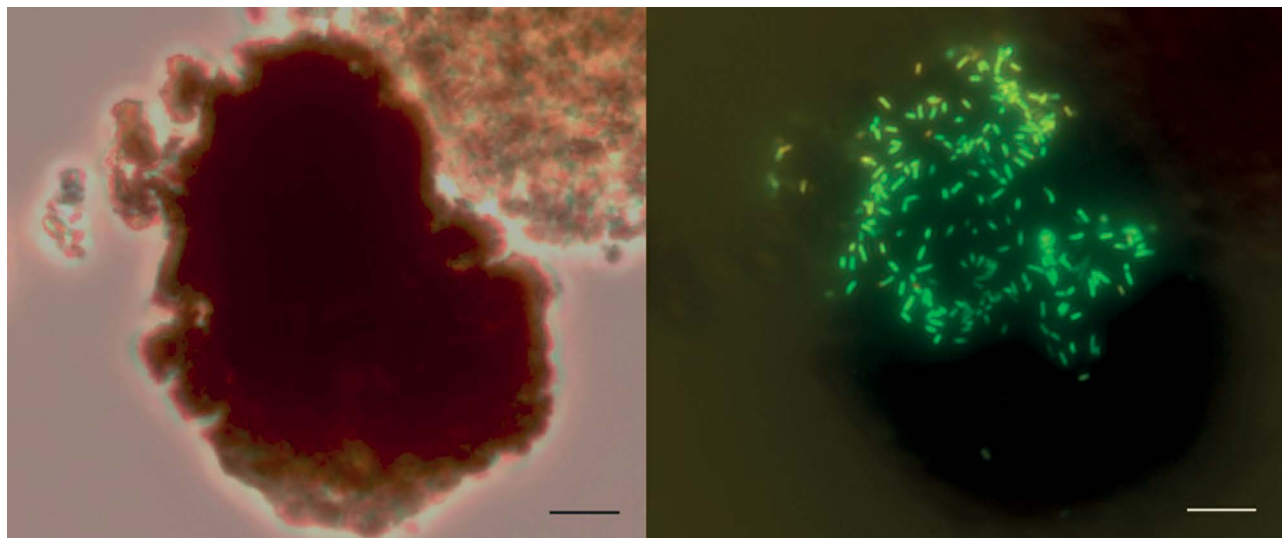


Рис. 3. Микрофотографии алкалотермофильного представителя рода *Parvivirga*, колонизирующего частицы ферригидрита на среде с молекулярным водородом в качестве донора электронов; а — фазово-контрастная микроскопия; б — флуоресцентная микроскопия того же препарата, окрашенного акридиновым оранжевым. Масштабная линейка — 10 мкм.

Накопительная культура на водороде характеризовалась практически идентичным составом сообщества с пируватом (рис. 2, табл. S1), однако филотип, близкий к *P. hydrogeniphila*, составлял в нем уже 52.3%, филотип, родственный *Candidatus* Dichloromethanomonas, обнаружен в нем не был, а 36.8% сообщества составлял филотип, близкий к *Meiothermus*, который ранее детектировался в исходной пробе и пробе с добавлением ферригидрита и органических кислот, составляя в них 10.5 и 12.3% прочтений соответственно.

Экологическая интерпретация полученных результатов

Известно, что выход Горячинских терм приурочен к разлому субширотного простирания. Источником трехвалентного железа, как потенциального акцептора электронов, здесь могут выступать железосодержащие минералы кристаллических пород — биотит, роговая обманка и амфибол или гидроокислы железа в песчаниках, составляющие до 10–20% водовмещающих пород (Ломоносов, 1974). Крайне важным является факт, что поток холодных вод в районе Горячинских терм имеет радиальный характер и направлен к очагу разгрузки, который, таким образом, имеет локальный характер и обусловлен сосредоточенным поступлением термальной воды с глубины по узкой зоне дробления кристаллических пород верхнепротерозойского возраста (рис. 4) (Плюсин и соавт., 2013).

Питание и пополнение подземных вод в данном районе происходит за счет атмосферных осадков и, в меньшей степени, конденсационных вод. В отношении формирования азотных терм Горячинска большинство исследователей придерживаются инфильтрационной гипотезы, согласно которой пресные холодные воды, попадая по трещинам на глубину, под воздействием высоких температур агрессивно взаимодействуют с вмещающими породами, изменяя свой первоначальный катионно-анионный и газовый состав (Пиннекер, 1969; Ломоносов, 1974). Исходно кислородно-азотные по газовому составу, они расходуют кислород на окислительно-восстановительные реакции, в частности, с участием двухвалентного железа, и, постепенно нагреваясь, переходят в чистые азотные термальные воды. Микроэлементный состав термальных вод Горячинска близок к составу пород Баргузинского интрузивного комплекса, в то время как содержание органического вещества идентично таковому в поверхностных водах (Гановичева, 1969). По мнению И.С. Ломоносова (1974), современные азотные термы Горячинска представляют собой разубоженные инфильтрационными водами силикатные растворы, сбросившие основной рудный груз при подъеме на поверхность. Сделанные геологические и гидрогеологические заключения позволяют предположить, что в исследуемом районе существует несколько пространственно ограниченных экологических ниш, пригодных для развития алкалотермофильных прокариот. К первой (I на рис. 4) следует отнести узкий участок дробления протерозойских кристаллических пород и залегающего

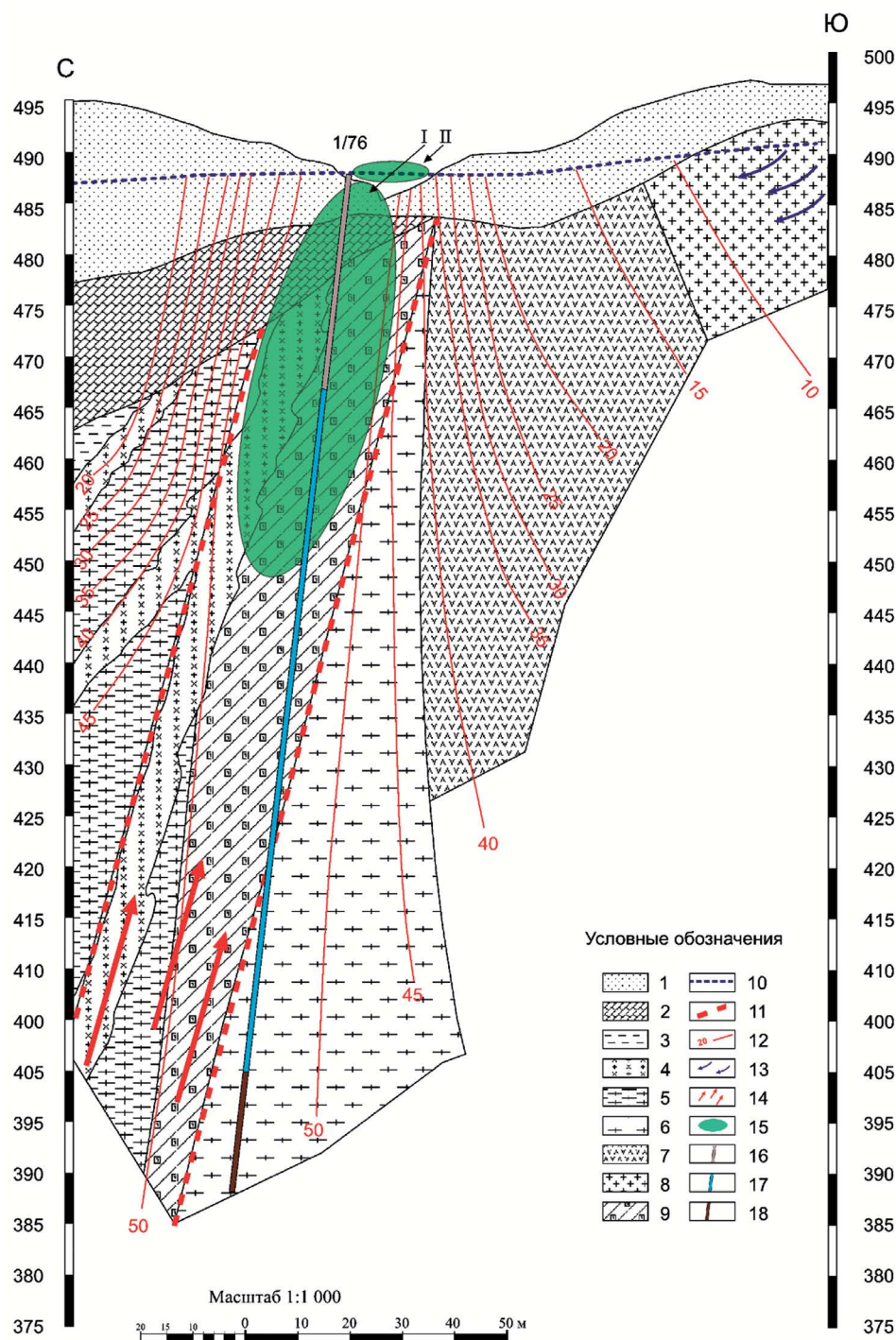


Рис. 4. Схематичный геолого-гидрогеологический разрез зоны тектонического дробления в районе Горячинского курорта. Составлен по фондовым материалам “Проект округа горно-санитарной охраны курорта Горячинск Бурятской АССР. Гидрогеологическое управление “Геоминвод”. Комплексная гидрогеологическая пария. Москва, 1984 г.”. Условные обозначения: 1 – пески четвертичного возраста; 2 – песчаники базальные, полимиктовые четвертичного возраста; 3 – песчаники; 4 – пегматиты; 5 – протерозойские плагиограниты; 6 – протерозойские гнейсоплагиограниты; 7 – протерозойские сиенит диориты и кварцевые диориты; 8 – гранодиориты; 9 – зона тектонического дробления и трещиноватости пород; 10 – пьезометрическая поверхность термальных и холодных вод; 11 – зона тектонического дробления и трещиноватости пород; 12 – изотермы через 5°C; 13 – направление движения холодных вод; 14 – направление движения горячих вод; 15 – зона развития алкалотермофильных микроорганизмов: I – подземная; II – наземная; 16–18 – конструкция скважины 1/76: 16 – обсадная труба; 17 – дырчатый фильтр; 18 – отстойник.

выше маломощного слоя песчаника, формирующие локальную зону разгрузки термальных вод, обеспечивающую возможность развития подземной термофильной микрофлоры. Вторая (II на рис. 4) поверхностная экониша формируется в русле ручья, образованного разгружающимися термальными щелочными водами. По мере удаления от скважины каменисто-песчаное дно ручья заливается за счет разлагающихся остатков высшей растительности, чему в большой степени способствуют ванночки, огороженные камнями, сделанные посетителями терм. Эти две экониши практически не различаются по температуре и pH, но резко контрастны по содержанию органического вещества — подземная алкалотермофильная микрофлора развивается в олиготрофных условиях, поверхностная — в эвтрофных.

Наши исследования в существенной степени подтвердили существование этих контрастных экониш. В результате проведенных исследований удалось доказать присутствие в них бактерий, способных к железоредукции в условиях повышенных температур и значений pH. Восстановление ферригидрита в пробах № 2 и 3, содержащих илистые осадки, богатые органикой, осуществлялось в основном за счет процесса облегченного брожения. Этот вывод обоснован тем фактом, что добавление ферригидрита практически не оказало влияния на состав и соотношение филоципов микробного сообщества первичных накопительных культур по сравнению с исходными пробами, что указывает на преимущественное развитие в них органотрофных анаэробных бактерий, осуществляющих разложение углеводов и белковых соединений. Гораздо перспективнее в смысле получения чистых культур диссимиляционных алкалотермофильных железоредукторов выглядит проба № 1, отобранная у грифона скважины 1/76 (рис. 1a). Содержания органики в исходной пробе оказалось недостаточным для восстановления ферригидрита в первичной накопительной культуре, а внесение дополнительных доноров электронов — смеси органических кислот или дрожжевого экстракта привело к существенному изменению исходного микробного состава пробы и позволило выявить филоципы, с высокой вероятностью ответственные за осуществление железоредукции в исследуемых условиях. Действительно, таксоны наиболее близкие к доминирующим в первичных накопительных культурах филоципам — представители родов *Desulfotomaculum*, *Thermincola*, некультивируемой группы Sva0485, по литературным данным являются хемоорганотрофными бактериями, способными к восстановлению железа в анаэробных условиях (Zavarzina et al., 2007; Byrne-Bailey, 2010; Otwell et al., 2018; Tan et al., 2019). Накопление представителей некультивируемой группы Sva0485 в присутствии

органических кислот и ферригидрита расширило знания о ее распространении, поскольку до сих пор филоципы этой группы обнаруживались в местообитаниях, связанных с циклами железа и серы, но характеризующихся кислыми или нейтральными условиями.

В результате проведенных исследований удалось получить несколько устойчивых накопительных культур алкалотермофильных бактерий, способных к диссимиляционной железоредукции за счет окисления молекулярного водорода или органических кислот при pH 9.0 и температуре 55°C. Существенное накопление представителей рода *Parvivirga* в литоавтотрофных условиях позволяет сделать несколько выводов об экологии этих микроорганизмов. Высокая специализация рода *Parvivirga*, заключающаяся в облигатной литоавтотрофной железоредукции (Khomyakova et al., 2022), как способе получения энергии, позволяет утверждать, что выявленный нами филоцип является представителем подземной микрофлоры Горячинских гидротерм. Отсутствие подходящих доноров электронов, а также окислительные условия в месте отбора проб объясняют его низкую представленность в исходной пробе и первичных накопительных культурах, находящуюся на пределе чувствительности метода: 0.02, 0.07% (дрожжевой экстракт), 1% (органические кислоты). В присутствии молекулярного водорода в анаэробных условиях эта группа получила значительное преимущество и составляла больше 50% сообщества.

Таким образом, наши исследования подтвердили сделанное ранее предположение Nixon et al. (2022) об отсутствии термодинамических, биохимических или кинетических ограничений для осуществления железоредукции в условиях повышенных температур и значений pH и позволяют надеяться на получение в скором времени чистых культур первых диссимиляционных алкалотермофильных железоредукторов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работы по выделению накопительных и чистых культур и анализу данных выполнены при поддержке проекта РНФ № 24-64-00023. Молекулярные исследования ААК, ААМ проведены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Будагаева В.Г., Бархутова Д.Д. Термофильные органотрофные бактерии рода *Meiothermus* в щелочных гидротермах Прибайкалья (Бурятия) // Самарский научный вестник. 2015. № 2 (11). С. 30–32.
- Ломоносов И.С. Геохимия и формирование современных гидротерм Байкальской рифтовой зоны. Новосибирск: Наука, Сиб. отделение, 1974. 164 с.
- Лукина А.П., Кадников В.В., Русанов И.И., Авакян М.Р., Белецкий А.В., Марданов А.В., Пименов Н.В., Равин Н.В., Карначук О.В. Анаэробные *Thermodesulfovibrio* и аэробные *Meiothermus* сосуществуют в глубоководной термальной воде // Микробиология. 2023. Т. 92. С. 250–260.
- Lukina A.P., Kadnikov V.V., Rusanov I.I. et al. Anaerobic *Thermodesulfovibrio* and aerobic *Meiothermus* coexist in deep thermal water // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 324–333.
<https://doi.org/10.1134/S0026261723600234>
- Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Подосокорская О.А., Тошчаков С.В. Анализ систем праймеров на ген 16S рРНК для профилирования термофильных микробных сообществ // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 671–680.
- Merkel A.Y., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V., Tarnovetskiy I.Y. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 671–680.
- Плюснин А.М., Замана Л.В., Шварцев С.Л., Токаренко О.Г., Чернявский М.К. Гидрогеохимические особенности состава азотных гидротерм Байкальской рифтовой зоны // Геология и геофизика. 2013. Т. 54. С. 647–664.
- Ясницкая Н.В., Ткачук В.Г. Гидротермальные ресурсы курорта Горячинск. Минеральные воды южной части Восточной Сибири // Гидрогеология минеральных вод и их народнохозяйственное значение / Под ред. Ткачук А.В., Толстихиной Н.И. М.–Л.: Изд-во Академии наук СССР, 1961. Т. 1. 348 с.
- Boltyanskaya Y.V., Kevbrin V.V., Grouzdev D.S., Detkova E.N., Koziaeva V.V., Novikov A.A., Zhilina T.N. *Halonatronomonas betaini* gen. nov., sp. nov., a haloalkaliphilic isolate from soda lake capable of betaine degradation and proposal of *Halarsenatibacteraceae* fam. nov. and *Halothermotrichaceae* fam. nov. within the order *Halanaerobiales* // Syst. Appl. Microbiol. 2023. V. 46. Art. 126407.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2023.126407>
- Bond P.L., Smriga S.P., Banfield J.F. Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 3842–3849.
<https://doi.org/10.1128/aem.66.9.3842-3849.2000>
- Byrne-Bailey K.G., Wrighton K.C., Melnyk R.A., Agbo P., Hazen T.C., Coates J.D. Complete genome sequence of the electricity-producing “*Thermincola potens*” strain JR // J. Bacteriol. 2010. V. 192. P. 4078–4079.
<https://doi.org/10.1128/JB.00044-10>
- Chen Y., He Y., Shao Z., Han X., Chen D., Yang J., Zeng X. *Thermosiphon ferrireducens* sp. nov., an anaerobic thermophilic iron(III)-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal sulfide deposits // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2021. V. 71. Art. 004929.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004929>
- Dalla Vecchia E., Suvorova E.I., Maillard J., Bernier-Latmani R. Fe(III) reduction during pyruvate fermentation by *Desulfotomaculum reducens* strain MI-1 // Geobiology. 2014. V. 12. P. 48–61.
<https://doi.org/10.1111/gbi.12067>
- Gohl D.M., MacLean A., Hauge A., Becker A., Walek D., Beckman K.B. An optimized protocol for high-throughput amplicon-based microbiome profiling // Protoc. Exch. 2016.
<https://doi.org/10.1038/protex.2016.030>
- Han S., Tang R., Yang S., Xie C.J., Narsing Rao M.P., Rensing C., Liu G.H., Zhou S.G. *Geothrix oryzisoli* sp. nov., a ferric iron-reducing bacterium isolated from paddy soil // Antonie van Leeuwenhoek. 2023. V. 116. P. 477–486.
<https://doi.org/10.1007/s10482-023-01817-0>
- Hao C., Zhang H., Haas R., Bai Z., Zhang B. A novel community of acidophiles in an acid mine drainage sediment // World J. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 23. P. 15–21.
[https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(07\)60074-6](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(07)60074-6)
- Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L., Andersson A.F. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. P. 5116–5123.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01403-14>
- Jin H.S., Dhanasingh I., Sung J.Y., La J.W., Lee Y., Lee E.M., Kang Y., Lee D.Y., Lee S.H., Lee D.W. The sulfur formation system mediating extracellular cysteine-cystine recycling in *Fervidobacterium islandicum* AW-1 is associated with keratin degradation // Microb. Biotechnol. 2021. V. 14. P. 938–952.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13717>
- Kaksonen A.H., Spring S., Schumann P., Kroppenstedt R.M., Puhakka J.A. *Desulfurispora thermophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, spore-forming sulfate-reducer isolated from a sulfidogenic fluidized-bed reactor // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. P. 1089–1094.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.64593-0>
- Kevbrin V.V., Zavarzin G.A. The influence of sulfur compounds on the growth of halophilic homoacetic bacterium *Acetohalobium arabaticum* // Microbiology (Moscow). 1992. V. 61. P. 563–571.
- Khomyakova M., Merkel A., Kopitsyn D., Slobodkin A. *Pelovirga terrestris* gen. nov., sp. nov., anaerobic,

- alkaliphilic, fumarate-, arsenate-, Fe(III)- and sulfur-reducing bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // *Syst. Appl. Microbiol.* 2022a. V. 45. Art. 126304.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2022.126304>
- Khomyakova M.A., Zavarzina D.G., Merkel A.Y., Klyukina A.A., Pikhiteva V.A., Gavrilov S.N., Slobodkin A.I. The first cultivated representatives of the actinobacterial lineage OPB41 isolated from subsurface environments constitute a novel order *Anaerosomatales* // *Front. Microbiol.* 2022b. V. 13. Art. 1047580.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1047580>
- Kleindienst S., Higgins S.A., Tsementzi D., Chen G., Konstantinidis K.T., Mack E.E., Löffler F.E. “*Candidatus Dichloromethanomonas elyunquensis*” gen. nov., sp. nov., a dichloromethane-degrading anaerobe of the *Peptococcaceae* family // *Syst. Appl. Microbiol.* 2017. V. 40. P. 150–159.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.12.001>
- Li Y., Yang G., Yao S., Zhuang L. *Paradesulfobacterium ferrireducens* gen. nov., sp. nov., a Fe(III)-reducing bacterium from petroleum-contaminated soil and reclassification of *Desulfotobacterium aromaticivorans* as *Paradesulfobacterium aromaticivorans* comb. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2021. V. 71.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005025>
- Marshall C.W., May H.D. Electrochemical evidence of direct electrode reduction by a thermophilic gram-positive bacterium, *Thermincola ferriacetica* // *Energy Environ. Sci.* 2021. V. 2. P. 699–705.
<https://doi.org/10.1039/b823237g>
- Merkel A.Y., Chernyh N.A., Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Slobodkin A.I. Diversity and metabolic potential of the terrestrial mud volcano microbial community with a high abundance of Archaea mediating the anaerobic oxidation of methane // *Life (Basel)*. 2021. V. 1. Art. 953.
<https://doi.org/10.3390/life11090953>
- Nixon S.L., Bonsall E., Cockell C.S. Limitations of microbial iron reduction under extreme conditions // *FEMS Microbiol. Rev.* 2022. V. 46. Art. fuac033.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuac033>
- Ogg C.D., Patel B.K. *Thermotalea metallivorans* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, anaerobic bacterium from the Great Artesian Basin of Australia aquifer // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59. P. 964–971.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.004218-0>
- Otwell A.E., Callister S.J., Sherwood R.W., Zhang S., Goldman A.R., Smith R.D., Richardson R.E. Physiological and proteomic analyses of Fe(III)-reducing co-cultures of *Desulfotomaculum reducens* MI-1 and *Geobacter sulfurreducens* PCA // *Geobiology*. 2018. V. 16. P. 522–539.
<https://doi.org/10.1111/gbi.12295>
- Podosokorskaya O.A., Merkel A.Y., Kolganova T.V., Chernyh N.A., Miroshnichenko M.L., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. *Fervidobacterium riparium* sp. nov., a thermophilic anaerobic cellulolytic bacterium isolated from a hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2011. V. 61. P. 2697–2701.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.026070-0>
- Raposo P., Viver T., Albuquerque L., Froufe H., Barroso C., Egas C., Rosselló-Móra R., da Costa M.S. Transfer of *Meiothermus chliarophilus* (Tenreiro et al.1995) Nobre et al. 1996, *Meiothermus roseus* Ming et al. 2016, *Meiothermus terrae* Yu et al. 2014 and *Meiothermus timidus* Pires et al. 2005, to *Calidithermus* gen. nov., as *Calidithermus chliarophilus* comb. nov., *Calidithermus roseus* comb. nov., *Calidithermus terrae* comb. nov. and *Calidithermus timidus* comb. nov., respectively, and emended description of the genus *Meiothermus* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019. V. 69. P. 1060–1069.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003270>
- Stookey L.L. Ferrozine—a new spectrophotometric reagent for iron // *Anal. Chem.* 1970. V. 42. P. 779–781.
- Sylvan J.B., Toner B.M., Edwards K.J. Life and death of deep-sea vents: bacterial diversity and ecosystem succession on inactive hydrothermal sulfides // *MBio*. 2012. V. 3. Art. e00279–11.
<https://doi.org/10.1128/mBio.00279-11>
- Tan S., Liu J., Fang Y., Hedlund B.P., Lian Z.H., Huang L.Y., Li J.T., Huang L.N., Li W.J., Jiang H.C., Dong H.L., Shu W.S. Insights into ecological role of a new deltaproteobacterial order *Candidatus Acidulodesulfobacterales* by metagenomics and metatranscriptomics // *ISME J.* 2019. V. 13. P. 2044–2057.
<https://doi.org/10.1038/s41396-019-0415-y>
- Vuillemin A., Horn F., Friese A., Winkel M., Alawi M., Wagner D., Henny C., Orsi W.D., Crowe S.A., Kallmeyer J. Metabolic potential of microbial communities from ferruginous sediments // *Environ. Microbiol.* 2018. V. 20. P. 4297–4313.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14343>
- Waite D.W., Chuvochina M., Pelikan C., Parks D.H., Yilmaz P., Wagner M., Loy A., Naganuma T., Nakai R., Whitman W.B., Hahn M.W., Kuever J., Hugenholtz P. Proposal to reclassify the proteobacterial classes *Deltaproteobacteria* and *Oligoflexia*, and the phylum *Thermodesulfobacteria* into four phyla reflecting major functional capabilities // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 5972–6016.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004213>
- Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. Formation of methane by bacterial extracts // *J. Biol. Chem.* 1963. V. 238. P. 2882–2888.
- Yarza P., Yilmaz P., Pruesse E., Glöckner F.O., Ludwig W., Schleifer K.H., Whitman W.B., Euzéby J., Amann R., Rosselló-Móra R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences // *Nat. Rev. Microbiol.* 2014. V. 12. P. 635–645.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>
- Yoshida H., Yamamoto K., Murakami Y., Katsuta N., Hayashi, T., Naganuma T. The development of Fe-nodules surrounding biological material mediated by microorganisms // *Environ. Geol.* 2008. V. 55. P. 1363–1374.

- Zakharyuk A.G., Kopitsyn D.S., Suzina N.E., Shcherbakova V. *Pelosinus baikalensis* sp. nov., an iron-reducing bacterium isolated from a cold freshwater lake // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 137–145. <https://doi.org/10.1134/S0026261722602913>
- Zavarzina D.G., Kolganova T.V., Boulygina E.S., Kostrikina N.A., Tourova T.P., Zavarzin G.A. *Geoalkalibacter ferrihydriticus* gen. nov. sp. nov., the first alkaliphilic representative of the family *Geobacteraceae*, isolated from a soda lake // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 673–682. <https://doi.org/10.1134/S0026261706060099>
- Zavarzina D.G., Prokofeva M.I., Pikhtereva V.A., Klyukina A.A., Maslov A.A., Merkel A.Y., Gavrillov S.N. *Deferrivibrio essentukiensis* sp. nov., gen. nov., a representative of *Deferrivibrionaceae* fam. nov., isolated from the subsurface aquifer of Caucasian Mineral Drinking Waters // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 143–159. <https://doi.org/10.1134/S0026261722020114>
- Zavarzina D.G., Sokolova T.G., Tourova T.P., Chernyh N.A., Kostrikina N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Thermincola ferriacetica* sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic bacterium capable of dissimilatory Fe(III) reduction // Extremophiles. 2007. V. 11. P. 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00792-006-0004-7>
- Zavarzina D.G., Maslov A.A., Merkel A.Y., Kharitonova N.A., Klyukina A.A., Baranovskaya E.I., Baydariko E.A., Potapov E.G., Zayulina K.S., Bychkov A.Y., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Gavrillov S.N. Shadows of the past – analogs of precambrian microbial communities formed *de novo* in Caucasian Mineral Water Aquifers // mBio. 2024. under revision.
- Zhang X., Tu B., Dai L.R., Lawson P.A., Zheng Z.Z., Liu L.Y., Deng Y., Zhang H., Cheng L. *Petroclostridium xylanilyticum* gen. nov., sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from an oilfield, and reclassification of clostridial cluster III members into four novel genera in a new *Hungateiclostridiaceae* fam. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 3197–3211. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002966>
- Zhang X., Yang G., Yao S., Zhuang L. *Shewanella shenzhenensis* sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium with abundant possible cytochrome genes, isolated from mangrove sediment // Antonie van Leeuwenhoek. 2022. V. 115. P. 1245–1252. <https://doi.org/10.1007/s10482-022-01763-3>

EXPERIMENTAL ARTICLES

Alkalo-Thermophilic Iron-Reducing Bacteria of the Goryachinskoe Thermal Water Deposit

D. G. Zavarzina^{1, *}, A. A. Klyukina¹, A. Yu. Merkel¹, T. A. Maslova², A. A. Maslov³

¹Winogradsky Institute of Microbiology, FRC “Fundamentals for Biotechnology” of the RA Sciences, Moscow, 119071, Russia

²Faculty of Chemical Engineering and Ecology, Gubkin Russian State University of Oil and Gas, Moscow, 119991, Russia

³Geological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: zavarzinatwo@mail.ru

A study of the metabolic group of iron-reducing prokaryotes that use the weakly crystalline mineral ferrihydrite as an electron acceptor has revealed its widespread distribution on Earth. However, the ability of iron reducers to develop in polyextreme conditions – at elevated pH values and temperatures – has not yet been demonstrated. To prove the existence of alkalithermophilic iron reducers, we studied water and sediment samples from the Goryachinsk nitrogen springs. These springs are confined to young tectonic faults of the Baikal rift zone, and their waters are characterized by low mineralization, high pH (8.8–9.2) and temperature (53–55°C). By adding synthesized ferrihydrite to water and bottom sediment samples from the Goryachinsk springs and incubating them under anaerobic conditions at temperatures of 50 and 55°C, enrichment cultures were obtained that reduce this mineral. Profiling of water and sediment samples and primary enrichment cultures by the 16S rRNA gene revealed their high phylogenetic diversity, represented almost exclusively by bacterial taxa. Further transfers with ferrihydrite and organic acids or hydrogen added as an electron donor allowed us to obtain stable enrichment cultures of organo- and lithotrophic alkalithermophilic iron reducers. From 30 to 50% of their total representation were representatives of the genus *Parvivirga*, one of the first cultivated representatives of the OPB41 group (now the order *Anaerosomatales*) of the phylum *Actinomycetota*.

Keywords: extremophilic prokaryotes, alkalithermophilic iron reducers, underground biosphere, hydrothermal vents, Baikal, *Parvivirga*