

***DEFERRIVIBRIO ESSENTUKIENSIS* SP. NOV., GEN. NOV. –  
ПРЕДСТАВИТЕЛЬ НОВОГО СЕМЕЙСТВА *DEFERRIVIBRIONACEAE* FAM.  
NOV., ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ ПОДЗЕМНОГО ВОДОНОСНОГО ГОРИЗОНТА  
КАВКАЗСКИХ МИНЕРАЛЬНЫХ ВОД<sup>1</sup>**

© 2022 г. Д. Г. Заварзина<sup>a, \*</sup>, М. И. Прокофьева<sup>a</sup>, В. А. Пихтерева<sup>b</sup>, А. А. Клюкина<sup>a</sup>,  
А. А. Маслов<sup>c</sup>, А. Ю. Меркель<sup>a</sup>, С. Н. Гаврилов<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, 119234 Россия

<sup>c</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Геологический факультет, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: zavarzinatwo@mail.ru

Поступила в редакцию 25.11.2021 г.

После доработки 01.12.2021 г.

Принята к публикации 01.12.2021 г.

Эссентукское месторождение Кавказских минеральных вод содержит запасы бальнеологически ценной питьевой минеральной воды, которая добывается из верхнемелового подземного водоносного горизонта, залегающего на глубине до 1 км, и остается практически неисследованной с микробиологической точки зрения. В ходе работы мы отобрали пробы этой воды через эксплуатационные скважины, работающие в непрерывном режиме, охарактеризовали филогенетическое разнообразие ее микробного сообщества и получили накопительные культуры термофильных железоредукторов из водоносного горизонта. Из накопительных культур была выделена новая анаэробная термофильная бактерия, восстанавливающая Fe(III) в составе минерала ферригидрита с ацетатом в качестве донора электронов. Новый изолят, обозначенный как штамм Es71-Z0220<sup>T</sup>, и отнесенный к порядку *Deferribacterales*, является термофильным, нейтрофильным, галотолерантным подвижным вибрионом. Он использует синтезированный ферригидрит, фумарат, нитрат или элементную серу в качестве акцепторов электронов с органическими кислотами в качестве доноров электронов. Штамм не способен к восстановлению растворимых комплексов Fe(III) и к брожению. В результате сборки генома штамма Es71-Z0220<sup>T</sup> было получено 65 контигов общей длиной 2.3 млн п.о. На основе полногеномной филогенетической реконструкции и физиологических свойств новый изолят был отнесен к новому семейству, роду и виду *Deferrivibrio essentukiensis* gen. nov., sp. nov. Геномный анализ выявил ключевые детерминанты известных путей анаэробного дыхания и углеродного метаболизма и характерные особенности предполагаемых путей переноса электронов на Fe(III). С учетом выявленных метаболических особенностей *Deferrivibrio essentukiensis*, мы предполагаем, что этот организм в его подземном местообитании участвует в биогеохимическом цикле углерода, сопрягая окисление органического вещества с восстановлением минералов Fe(III).

**Ключевые слова:** *Deferribacterales*, подземная биосфера, железоредукция, термофилы, водоносные горизонты, минеральные воды

**DOI:** 10.31857/S0026365622020136

Питьевые минеральные воды представляют собой один из наиболее значимых природных ресурсов. Официально, к этому типу вод относятся только микробиологически неизменные воды. Самоизливающиеся природные источники или каптируемые скважинами подземные минеральные воды являются объектами тщательной защиты от загрязнения, гарантирующей сохранение их

первоначального химического и микробного состава при эксплуатации месторождений (Loy et al., 2005). Это неудивительно, учитывая, что предположения о значительном влиянии метаболической активности микроорганизмов на генезис минеральных вод были выдвинуты уже довольно давно (Leclerc et al., 2005). Однако филогенетическое и метаболическое разнообразие микробных сообществ и отдельных микроорганизмов, населяющих подземные водоносные горизонты, до сих пор остается недостаточно изученным. В этой

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365622020136 для авторизованных пользователей.

связи следует упомянуть недавние работы, описывающие филогенетический состав сообществ нескольких европейских бутилированных минеральных вод и их источников (Lesaulnier et al., 2017; Krauze et al., 2017; Sala-Comogera et al., 2020). Эти исследования показали преобладание *Gammaproteobacteria* в большинстве проанализированных микробных сообществ и значительные различия в их филогенетических профилях на уровне порядков и семейств. В то же время, участие микробиоты минеральных вод в формировании их состава осталось практически неизученным. Микробиологические исследования по этому вопросу могут стать важным инструментом оценки ресурсов минеральных вод, необходимым для их правильной эксплуатации. Применительно к подземным месторождениям минеральных вод, работы по оценке микробного разнообразия предоставляют микробиологам уникальную возможность изучить автохтонную микрофлору подземных водоносных горизонтов, недоступных для прямого отбора проб, и оценить ее геохимическую активность и экологическую роль.

Объектом нашего исследования стало Эссентукское месторождение минеральных вод (ЕММВ), расположенное в Кисловодско-Кумагорской тектонической зоне повышенной трещиноватости (Предкавказье) и имеющее сложные гидрогеологические условия, обусловленные геологическим строением. Основной гидрогеохимической особенностью ЕММВ является газогидрогеохимическая аномалия (инверсия) минеральных вод. Ее формированию способствовали своеобразный палеогидрогеодинамический режим в горизонтах разного возраста и процессы альпийского цикла геологического развития Кавказского региона, которые привели к образованию сложной системы разнонаправленных субширотных и субмеридиональных линейных и кольцевых зон разломов в осадочных породах. Считается, что сложность геологического строения региона обуславливает большое разнообразие минеральных вод ЕММВ с минерализацией от практически пресных (0.5–0.9 г/л) до высокоминерализованных вод (10.0–14.0 г/л), температурой от 10 до ~70°C и изменчивостью преобладающих анионов (карбонатные, бикарбонатные, хлоридные или сульфатные) (Абрамов, Вавичкин, 2010; Lavrushin et al., 2020; Filimonova et al., 2020). Система разломных зон в регионе служит каналом для ювенильных газов, прежде всего, CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub> (Filimonova et al., 2020), которые могут обеспечивать хемотрофную часть микробного сообщества источниками углерода и энергии, например, в процессах метано- или ацетогенеза. Наличие этих газов в сочетании с неорганическими акцепторами электронов, в первую очередь с минералами Fe(III) и соединениями серы, присутствующими в водовмещающих породах, создает потенциал для развития большого

разнообразия метаболических процессов, обеспечивающих развитие и поддержание микробной жизни в водоносных горизонтах ЕММВ. Микробные сообщества этих подземных экосистем привлекали внимание исследователей в течение нескольких десятилетий, но, в основном, в центре внимания предыдущих микробиологических исследований в регионе были культивируемые сульфатредукторы или условно-патогенные микроорганизмы, способные к деградации рассеянного органического вещества (см. Потапов и соавт., 2014, 2017 и ссылки в них).

В 2018 г. на ЕММВ была начата масштабная программа по переоценке запасов подземных минеральных вод. В рамках программы многие эксплуатационные скважины работали с максимальной производительностью в течение длительного периода, что позволило отбирать пробы подземных минеральных вод, добываемых из водоносных горизонтов глубиной до 1 км, непосредственно из устья скважины, избегая погрешностей, связанных с застоем воды в ее стволе. В рамках этой программы был произведен отбор проб воды из 2-х скважин для микробиологических исследований. Обе скважины вскрывают один и тот же верхнемеловой водоносный горизонт, из которого добывается одна из наиболее бальнеологически ценных минеральных вод ЕММВ (тип “Эссентуки № 4”).

Целью настоящей работы было описание физиологических и геномных особенностей диссимиляционной железоредуцирующей бактерии, выделенной из отобранных проб подземных минеральных вод ЕММВ и представляющей новый вид, род и семейство в порядке *Deferribacterales* филума *Deferribacterota*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Пробы и накопительные культуры.** Пробы минеральных вод отбирали из скважины 71 в сентябре 2020 года и из скважины 71Н в июле 2021 года. Обе скважины (E 42°56'30" N 44°11'20") расположены в 14 м друг от друга и имеют глубину 999 м с открытым стволом в интервале 676.0–998.9 м. Минеральные подземные питьевые воды добываются из верхнемелового сеноман-маастрихтского водоносного горизонта (K<sub>2</sub>s-m), простирающегося по всей площади ЕММВ. Общая мощность водоносного горизонта, сложенного известняками, переслаиваемыми пачками мергелей и песчаников, и характеризующегося сложными гидродинамическими условиями, колеблется от 300 до 350 м. Скважина 71 используется для промышленной добычи минеральной воды типа “Эссентуки № 4”, а скважина 71Н используется как резервная для скважины 71. Образцы воды из обеих скважин использовали в качестве посевного материала для выделения железоредуцирующих

микроорганизмов, которые могут развиваться в осадочных породах водоносного горизонта. Образцы из основной добывающей скважины 71 использовали также для выделения ДНК и дальнейшего филогенетического профилирования микробного сообщества этой минеральной воды. Для оценки филогенетического разнообразия микробного сообщества исследуемой минеральной воды образцы для последующего выделения ДНК отбирали из добывающей скважины 71 с помощью мембранных фильтрационных установок ФМ02-1000 объемом 1 л (Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия) с трековыми мембранными фильтрами с размером пор 0.2 мкм (ОИЯИ, Дубна, Россия). Предварительно стерилизованные фильтрационные установки собирали на месте, подключали к устьевой арматуре через стерильные штуцеры и шланги и пропускали по 100 л воды на каждый образец через фильтры под естественным избыточным давлением скважин (4–6 атм. на устье). По окончании фильтрации остатки воды полностью продавливали через фильтры выходящими из скважин газами, фильтры замачивали в буфере А (100 мМ Трис-НСl, рН 8.0; 100 мМ ЭДТА; 150 мМ NaCl), перевозили в лабораторию в стерильных 15-мл пробирках Falcon на льду и замораживали при  $-20^{\circ}\text{C}$  для хранения до последующего выделения ДНК.

Для получения накопительных культур использовали стерильные пробирки Хангейта объемом 17 мл для анаэробного культивирования, предварительно заполненные 100%  $\text{CO}_2$  и субстратами, необходимыми для развития целевых метаболических групп микроорганизмов. Пробы воды, отобранной из скважины, объемом 10 мл вносились в пробирки стерильными шприцами, после чего пробирки инкубировали в темноте при температуре  $47^{\circ}\text{C}$  – средней температуре, наблюдаемой при эксплуатации скважины в непрерывном режиме. Таким образом, образцы воды служили как основой минеральной среды, так и посевным материалом для накопления целевой группы микроорганизмов.

**Профилирование сообщества путем секвенирования фрагментов генов 16S рРНК.** Для профилирования микробного сообщества минеральной воды по фрагментам гена 16S рРНК ДНК выделяли непосредственно из замороженных фильтров с помощью набора реагентов FastDNA Spin Kit for Soil (“MP Bio”, США) в соответствии с инструкциями производителя. Библиотеки ампликонов V4-участка гена 16S рРНК получали, как описано ранее (Gohl et al., 2016), используя праймеры 515F (5'-GTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3' (Huggerth et al., 2014)) – Pro-mod-805R (5'-GACTACNVGGGTMTCATCC-3' (Меркель и соавт., 2019)). Библиотеки были получены в двух повторностях и секвенированы на системе MiSeq (“Illumina”, Калифорния, США) с использованием картири-

джа парного чтения длиной 150 нуклеотидов. Биоинформационный анализ профилей генов 16S рРНК проводили в соответствии с (Merkel et al., 2021). Все результаты секвенирования генов 16S рРНК были депонированы в NCBI BioProject PRJNA760784.

**Секвенирование генома, сборка, аннотация и филогенетический анализ.** ДНК штамма Es71-Z0220<sup>T</sup> для секвенирования генома выделяли с помощью набора реагентов FastDNA Spin Kit (“MP Bio”, США). Геном секвенировали на системе NextSeq (“Illumina”, Калифорния, США) с использованием набора реагентов, обеспечивающего считывание  $2 \times 100$  п.о. В результате сборки прочтений генома с помощью программы Unicycler v0.4.8 (Wick et al., 2017) было получено 65 контигов общим размером 2362387 п.о. (значение N50 – 77140 п.о.). Окончательное покрытие сборки генома составило 1207 раз. Автоматическая аннотация была выполнена с помощью программы PGAP 2021-07-01 (Tatusova et al., 2016). Сборка генома была депонирована как Whole Genome Shotgun project в базу данных DDBJ/ENA/GenBank под номером JAJAFU000000000.

Уточнение автоаннотаций и других предсказаний функций генов проводили вручную, как описано ранее (Toshchakov et al., 2018). Мультигеновые цитохромы были предсказаны с использованием аминокислотных последовательностей цитохромов, участвующих во внеклеточном переносе электронов (ВПЭ) у *Geobacter sulfurreducens* (Butler et al., 2010; Aklujkar et al., 2013), *Shewanella oneidensis* (Coursolle et al., 2010; Schicklberger et al., 2013), “*Thermincola potens*” (Carlson et al., 2012; Costa et al., 2019) и *Carboxydotherrmus ferrireducens* (Gavrilov et al., 2021), в качестве запросов. Гем-связывающие мотивы предсказывали, как описано ранее (Mardanov et al., 2015). Внутриклеточную локализацию мультигеновых цитохромов предсказывали на основе консенсусных результатов предсказаний онлайн-сервисов ТМНММ 2.0 (на базе CBS Prediction Servers, <http://www.cbs.dtu.dk/services>) и Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>). Консервативные домены предсказывали с помощью онлайн-сервиса HMMSCAN (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>) с учетом баз данных белковых семейств Pfam, TIGRFAM, Gene3D, Superfamily, PIRSF и TreeFam.

Для полногеномной филогенетической реконструкции использовали 120 консервативных маркерных однокопийных генов бактерий, как описано ранее (Parks et al., 2020). Филогенетические деревья были построены с помощью программ IQ-TREE 2 (Nguyen et al., 2015) с быстрым выбором модели посредством ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) и сверхбыстрой аппроксимацией для филогенетического бутстреп-теста (Hoang et al., 2018), а также тестом приблизительного

отношения правдоподобия для ветвлений (Anisimova, Gascuel, 2006).

**Физиологические исследования.** Базовая среда (А) для выделения чистой культуры, содержала (г/л):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 0.33;  $\text{KCl}$  – 0.33;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.33;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.33;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0.33;  $\text{NaCl}$  – 2.0;  $\text{NaHCO}_3$  – 6.0;  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  – 0.5; 1 мл/л раствора микроэлементов (Кевбрин, Заварзин, 1992); 1 мл/л раствора витаминов (Wolin et al., 1963). Ацетат натрия (20 мМ) использовали в качестве донора электронов и основного источника углерода, а синтезированный ферригидрит (СФ) служил целевым акцептором электронов для микроорганизмов, восстанавливающих  $\text{Fe(III)}$ . СФ готовили, как описано ранее (Заварзина и соавт., 2006), и добавляли в среду перед стерилизацией до конечного содержания  $\text{Fe(III)}$  50 мМ. Среду готовили анаэробно, охлаждали под  $\text{CO}_2$  (100%), разливали по 10 мл в пробирки Хангейта под током  $\text{CO}_2$  и автоклавировали при  $121^\circ\text{C}$  в течение 20 мин; рН среды (А) после стерилизации равен 6.7. Чистая культура была протестирована на способность роста с растворимым акцептором электронов фумаратом (20 мМ). После успешного тестирования были определены оптимальные концентрации  $\text{NaCl}$  и  $\text{NaHCO}_3$  для роста нового изолята, и среда была оптимизирована путем добавления 7.0 г/л  $\text{NaCl}$ , 6.0 г/л  $\text{NaHCO}_3$  и 0.3 г/л  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  в качестве восстановителя; рН среды после автоклавирования 7.1. Оптимизированная среда (Б) была использована для дальнейшей физиологической характеристики изолята. Для определения спектра акцепторов электронов, используемых изолятом, с ацетатом в качестве донора электронов были использованы: кротонат (10 мМ); антрахинондисульфат (АХДС/АQDS, 10 мМ); элементная сера (1 мас. %); сульфат (20 мМ); сульфит (2 мМ); тиосульфат (10 мМ); диметилсульфоксид (10 мМ); селенит (5 мМ); нитрат (10 мМ); растворимые формы  $\text{Fe(III)}$  (цитрат или  $\text{Fe(III)}$ -ЭДТА, по 10 мМ). Из состава сред, содержащих нитрат и соединения железа, сульфид был исключен. Для рутинных пересевов, тестов на устойчивость к антибиотикам, определения оптимума температуры и рН использовали среду (Б) с фумаратом и ацетатом натрия, восстановленную  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ . Инкубацию проводили при  $47^\circ\text{C}$ , если не указано иное. Все физиологические тесты проводились в двух повторностях.

Морфологию клеток исследовали с помощью фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии с использованием микроскопа Axio Lab.A1 (“Zeiss”, Германия), ультраструктуру клеток – с помощью электронного микроскопа JEM-100 (“JEOL”, Япония), как описано ранее (Заварзина и соавт., 2006). Рост культуры отслеживали прямым подсчетом клеток с помощью фазово-контрастной микроскопии. Для отслеживания роста

культуры с СФ, клетки окрашивали ДНК-связывающим красителем (акридиновым оранжевым) и визуализировали с помощью флуоресцентной микроскопии.

Для определения оптимальных условий роста на среде (Б) были протестированы температуры от 24 до  $65^\circ\text{C}$ , концентрации  $\text{NaCl}$  до 25 г/л,  $\text{NaHCO}_3$  до 20 г/л и рН от 6.0 до 8.15. Подсчет клеток проводили на протяжении 2–14 дней инкубирования. Оптимальные для роста концентрации  $\text{NaCl}$  определяли на модифицированной среде (Б), в которой все хлориды были заменены эквивалентными концентрациями нитратов или сульфатов. Значения рН всех использованных сред регулировали с помощью 6 М раствора  $\text{HCl}$  или 12 М раствора  $\text{NaOH}$ , щелочные среды готовили с использованием газовой смеси  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (80/20 об. %).

Аэробный и микроаэробный рост проверяли с использованием среды (Б), не содержащей восстановителя, при 2, 4, 10%  $\text{O}_2$  или 100% воздуха в газовой фазе. Активность каталазы проверяли по образованию пузырьков при обработке биомассы 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , активность оксидазы определяли с 1%-м раствором тетраметилпарафенилендиамина (Sarruccino et al., 2002).

Помимо ацетата был протестирован набор следующих субстратов и доноров электронов: лактат, пируват, сукцинат, метанол, этанол, н-пропанол, бутанол, формиат, малат, цитрат, N-ацетил-D-глюкозамин, глюкоза, сахароза, целлобиоза, микрокристаллическая и карбоксиметилцеллюлоза, пептон, дрожжевой и мясной экстракты, триптон. Также, в качестве донора электронов в отсутствие органических соединений был протестирован молекулярный водород (100% в газовой фазе). Рост считался положительным, если в течение трех последовательных пересевов на одну и ту же среду с одним и тем же субстратом не наблюдали снижения численности клеток, и если количество клеток в три раза превышало таковое в контрольном эксперименте без субстрата. Все органические субстраты (пептиды, углеводы, спирты и органические кислоты) были простерилизованы с помощью шприцевых фильтров с размером пор 0.2 мкм (“Millipore”) и добавлены до их конечной концентрации 0.3 мас. %. Использование несбраживаемых субстратов тестировали с использованием СФ в качестве акцептора электронов. Способность к анаэробному дыханию исследовали на оптимизированной среде (Б) с ацетатом в качестве субстрата. Чувствительность к антибиотикам проверяли на среде (Б) с фумаратом и ацетатом. Концентрированные растворы отдельных антибиотиков стерилизовали с помощью шприцевых фильтров и вносили в пробирки со стерильной средой.

Потребление ацетата определяли на газовом хроматографе Кристалл 5000.2 (“Хроматэк”, Рос-

сия), оснащенном детектором катарометром и колонкой с молекулярным ситом 5A (1 м), с аргонном в качестве газа-носителя. Образцы для хроматографии получали центрифугированием (при 12000 g в течение 3 мин) выросшей культуры с последующим подкислением отобранного супернатанта особо чистой муравьиной кислотой до pH 2.0.

Образование сульфида при росте с соединениями серы определяли по Трюперу и Шлегелю (Trüper, Schlegel, 1964). Образование Fe(II) при росте на соединениях Fe(III) контролировали с помощью феррозина (Stookey, 1970) с предварительной экстракцией Fe(II) из СФ и магнетита 0.6 н HCl; восстановление АХДС контролировали по изменению цвета среды.

При росте на нитрате продукцию нитритов оценивали с помощью нитритных тест-полосок (MerckQuant, “Merck”, Германия), а концентрация аммония определяли с помощью индофенола, как описано ранее (Scheiner, 1976).

Для анализа жирных кислот изолят выращивали в оптимальных физико-химических условиях. Биомассу собирали в поздней экспоненциальной фазе роста. Профили клеточных жирных кислот определяли методом ГХ-МС (на установке Thermo Scientific Trace GC Ultra DSQ II с колонкой HP-5MS, EI70 eV) метиловых эфиров, приготовленных из 5 мг сублимированной биомассы, обработанной безводной смесью HCl/метанол, по времени удерживания (с использованием стандартов “Supelco”, “Merck”, Германия), эталонным значениям эквивалентной длины цепи (Härtig, 2008) и масс-спектрам (программа NIST MS Search 2.0, поставляемая с установкой ГХ-МС). Содержание жирных кислот в клетках определяли в процентах от общей площади пика ионного тока.

Изопреноидные хиноны выделяли по методу Коллинза (Collins, Jones, 1981; Collins, 1985) и анализировали с помощью масс-спектрометра tandemного типа LCQ ADVANTAGE MAX и ионизационного масс-спектрометра Finnigan Mat 8430.

Спектрофотометрическое определение цитохромов *c*-типа проводили на основе быстрого сканирования спектра поглощения УФ-видимого света микробными клетками или их фракциями, позволяющего определить редокс-состояние цитохромов по специфическим пикам поглощения, как описано ранее (Mardanov et al., 2015). В настоящем исследовании анализ был модифицирован: цитохромы определяли непосредственно в суспензии целых клеток, выращенных на fumarate, а реокисление суспензии, восстановленной дитионитом, проверяли с помощью 1 mM растворимого цитрата железа(III). Температура инкубации (47°C) соответствовала оптимуму роста изолята.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Характеристика места отбора проб.** Отобранная минеральная вода относится к минеральным лечебно-питьевым водам типа “Ессентуки № 4”. Основные физико-химические характеристики воды из скважин 71 и 71Н на момент отбора проб представлены в табл. 1. Эти данные позволяют охарактеризовать ее как термальную, слабощелочную, углекислую минеральную воду.

**Филогенетический профиль микробного сообщества минеральной воды, отобранной из устья скважины 71.** Анализ минеральной воды, отобранной из устья скважины 71, методом профилирования по гену 16S рРНК выявил преобладание в ней гидрогенотрофных метаногенных архей рода *Methanothermobacter* (37%). Эти археи вместе с филотипами, принадлежащими к роду *Methanobacterium* и семейству *Methanomicrobiaceae*, представляли собой наиболее многочисленную группу микробного сообщества и составили 41% всех прочтений генов 16S рРНК (рис. S1). Вторая по численности группа микробного сообщества была представлена филотипами, относящимися к сульфатредуцирующим гидрогенотрофным видам рода *Thermodesulfovibrio* (19%). 12% прочтений были представлены неклассифицированными филотипами филума “*Spirochaetota*”, 9% – неидентифицированными бактериальными филотипами. Глубокая филогенетическая линия некультивируемых актинобактерий (класс *Coriobacteriia*, группа уровня порядка OPB41) составила 6% всех прочтений. Неклассифицированные филотипы семейства *Rhodocyclaceae* и различные некультивируемые фирмикуты составляли 3 и 5% всех прочтений гена 16S рРНК соответственно.

Среди малочисленных групп сообщества, каждая из которых составляла менее 1% прочтений, было зафиксировано несколько таксонов, содержащих известные железовосстанавливающие микроорганизмы, один из которых, относящийся к порядку *Deferribacterales*, был представлен одной последовательностью гена 16S рРНК.

**Накопительные и чистые культуры.** Активный рост железоредуцирующих микроорганизмов наблюдался после четырех суток инкубации первичной накопительной культуры, содержащей минеральную воду скважины 71, СФ и ацетат. Рост сопровождался трансформацией СФ в черный магнитный минерал, предположительно магнетит. Микроскопия препаратов, окрашенных акридиновым оранжевым, показала наличие в них вибрионов и очень мелких палочек, ассоциированных с минеральными частицами, а также планктонных коккоидных клеток различного диаметра.

Профилирование первичной накопительной культуры по гену 16S рРНК выявило преобладание новых представителей порядка *Deferribacterales* (представленность 79%), которые имели низкий

**Таблица 1.** Основные физико-химические характеристики проб минеральной воды из скважин 71 и 71Н, полученных на устьях скважин в сентябре 2020 и июле 2021 г. соответственно

Скважина	pH	T, °C	E <sub>h</sub> , мВ	TDS, г/л	ОУ, г/л	ООУ г/л	Газовый фактор, м <sup>3</sup> /м <sup>3</sup>					
71	6.8	40.5	+205	9.0	884.0	23.4	1.26					
71Н	7.2	43.0	Н.о.	8.92	Н.о.	Н.о.	1.23					
Основные катионы и анионы, мг/л												
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Cl <sup>-</sup>	F <sup>-</sup>	Br <sup>-</sup>	B	Li <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
71	2616.0	37.4	30.9	25.5	4382.0	<0.1	1943.0	<0.3	6.1	5.0	0.6	<0.1
71Н	2690.0	21.0	48.0	23.0	4296.0	9.0	1816.0	4.1	7.0	9.6	0.9	0.2
Состав свободного газа, об. %												
	H <sub>2</sub>		N <sub>2</sub>		CH <sub>4</sub>			CO <sub>2</sub>				
71	0.015		26		9			67				
71Н	НО		НО		23			76				

Примечание. Данные по E<sub>h</sub> приведены относительно стандартного водородного электрода; TDS – общая минерализация; ОУ – общий углерод; ООУ – общий органический углерод; н.о. – не определяли; НО – не обнаружен.

уровень сходства с ближайшим культивируемым организмом этого порядка *Petrothermobacter organivorans* (93.63% сходства фрагмента гена 16S рРНК). Помимо этого фило типа в сообществе присутствовали представители некультивируемого порядка актинобактерий ОРВ41 (3% относительной численности), спирохеты вида *Rectinema cohabitans* (13%) и представители рода *Caldicoprobacter* (5%) (рис. S2). Доминирующая бактерия была выделена в чистую культуру методом последовательных десятикратных разведений. В последнем положительном разведении (10<sup>-7</sup>) развивались морфологически однородные подвижные вибрионы. Чистота культуры, обозначенной как штамм Es71-Z0220<sup>T</sup> (=VKM В-3557 = JCM 39245), была подтверждена секвенированием гена 16S рРНК.

Применение тех же условий культивирования к пробе воды скважины 71Н, отобранному через 9 мес. после выделения штамма Es71-Z0220<sup>T</sup>, привело к выделению еще одного представителя порядка *Deferribacteriales*. Анализ полной последовательности генов 16S рРНК показал, что этот представитель, обозначенный как штамм Es71N, принадлежит к тому же виду, что и штамм Es71-Z0220<sup>T</sup> (сходство полной последовательности генов 16S рРНК 99.67%).

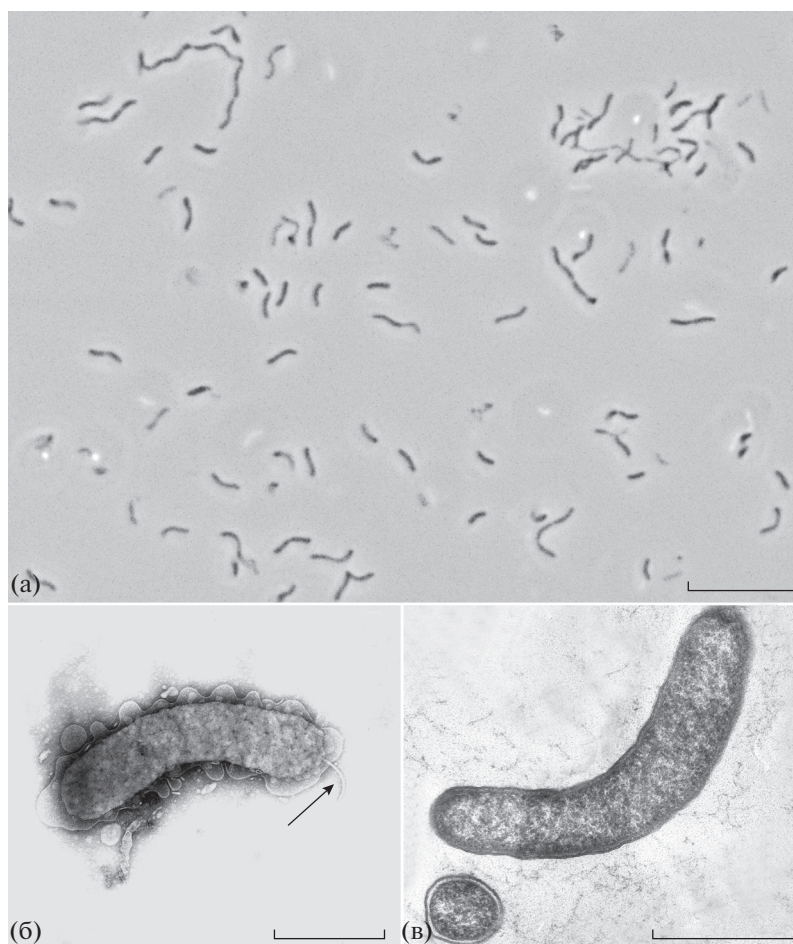
**Фенотипическая и хемотаксономическая характеристика.** Клетки штамма Es71-Z0220<sup>T</sup> представляли собой вибрионы толщиной 0.4–0.5 мкм и длиной 1–3 мкм, встречающиеся поодиночке, парами или длинными цепочками. Цепочки наблюдались только в неоптимальных условиях роста (рис. 1а). В поздней экспоненциальной фазе роста клетки образовывали сферопласты и часто скапливались в плотные клубки длинных цепочек.

Спорообразования не наблюдалось. Подвижность клеток обеспечивалась одним полярно расположенным жгутиком (рис. 1б). Ультратонкий срез выявил грамтрицательный тип клеточной стенки (рис. 1в).

Штамм Es71-Z0220<sup>T</sup> являлся облигатным анаэробом. Рост не наблюдался в аэробной среде или при 2% или более высоком содержании O<sub>2</sub> в газовой фазе. Более того, клетки быстро лизировались на воздухе, а их количество в открытой пробирке Хангейта уменьшалось вдвое за 45 мин. Штамм оказался каталазо- и оксидазоположительным. Это умеренный термофил, растущий в диапазоне температур от 30 до 54°C, с оптимумом при 47°C. При 24 и 60°C роста не наблюдалось. pH-диапазон роста при 47°C составлял 6.2–7.9, с оптимумом при pH 7.1. При pH ниже 6.0 или выше 8.15 рост не наблюдался. Штамм Es71-Z0220<sup>T</sup> рос при концентрациях NaCl от 0 до 18 г/л с оптимумом при 6–8 г/л, т.е. являлся галотолерантным. При 20 г/л NaCl рост не наблюдался (рис. S3). Рост наблюдался при концентрации бикарбоната натрия от 0 до 20 г/л с оптимумом при 7–8 г/л (рис. S3). Минимальное время удвоения составило 3 ч при оптимальных условиях роста (47°C, pH 7.1; 10 мМ фумарата и ацетата; 0.3 г/л Na<sub>2</sub>S · 9H<sub>2</sub>O; 7 г/л NaHCO<sub>3</sub>; 6.0 г/л NaCl).

Штамм Es71-Z0220<sup>T</sup> был способен к окислению ацетата, лактата, пирувата, сукцината (табл. 2), в то время как молекулярный водород, метанол, этанол, n-пропанол, бутанол, формиад, малат, цитрат, N-ацетил-D-глюкозамин, карбоксиметил- и микрокристаллическая целлюлоза не окислялись организмом и не поддерживали его рост в присутствии СФ как акцептора электронов. Штамм





**Рис. 1.** Морфология клеток штамма Es71-Z0220<sup>T</sup>: а – фазово-контрастная фотография культуры, выращенной с фумаратом и ацетатом, в стационарной фазе роста; б – просвечивающая электронная микрофотография клетки со жгутиком; в – просвечивающая электронная микрофотография ультратонкого среза клетки, демонстрирующая граммотрицательную структуру клеточной стенки. Масштабные линейки: а – 10 мкм; б, в – 0.5 мкм.

Es71-Z0220<sup>T</sup> был неспособен к сбраживанию пептона, дрожжевого или мясного экстрактов, триптона, глюкозы, сахарозы или целлобиозы. В качестве акцепторов электронов организм использовал СФ, фумарат, нитрат и элементную серу с ацетатом как донором электронов. АХДС, сульфат, сульфит, тиосульфат, диметилсульфоксид, селенит, кротонат, а также растворимые формы Fe(III), цитрат железа и Fe(III)-ЭДТА, не поддерживали рост организма. Штамм Es71-Z0220<sup>T</sup> восстанавливал СФ до черного магнитного осадка (рис. 2а), образуя 46 мМ Fe(II) одновременно окисляя 15 мМ ацетата (рис. 3). Рост на нитрате сопровождался образованием примерно 0.2–0.4 мМ нитрита в качестве промежуточного продукта и приводил в итоге к образованию  $3.95 \pm 0.25$  мМ аммония в стационарной фазе роста. Рост на элементной сере с ацетатом был слабее, чем на СФ, фумарате или нитрате (табл. 2). Тем не менее, по достижении стационарной фазы роста на сере была детектирована продукция  $2.76 \pm 0.24$  мМ сульфида.

Штамм Es71-Z0220<sup>T</sup> был устойчив к ингибитору рибосомального биосинтеза белка канамицину (100 мг/л) и чувствителен к нескольким другим типам антибиотиков. Его рост прекращался под действием ингибитора рибосомального биосинтеза белка неомицина (10 мг/л), ингибиторов биосинтеза клеточной стенки ванкомицина (80 мг/л) и ампицилина (100 мг/л), а также ингибитора ДНК-зависимой РНК-полимеразы рифампицина (0.1 мг/л).

**Состав жирных кислот, полярных липидов и хинонов, окислительно-восстановительный спектр цитохромов.** Преобладающими жирными кислотами липидной мембраны штамма Es71-Z0220<sup>T</sup> были следующие насыщенные жирные кислоты с длиной и/или разветвленной цепью: 9С-C<sub>14:0</sub>, С<sub>16:0</sub>, С<sub>18:0</sub>, *изо*-С<sub>14:0</sub>, 14С-C<sub>15:0</sub> (табл. 2 и S1). Основным изопреноидным менахиноном, обнаруженным у штамма Es71-Z0220<sup>T</sup>, был МК-8, детектированный ранее у представителей *Deferribacte-*

Таблица 2. Сравнительные характеристики штамма Es71-Z0220<sup>T</sup> и типовых видов родов, относящихся к порядку *Deferribacterales*

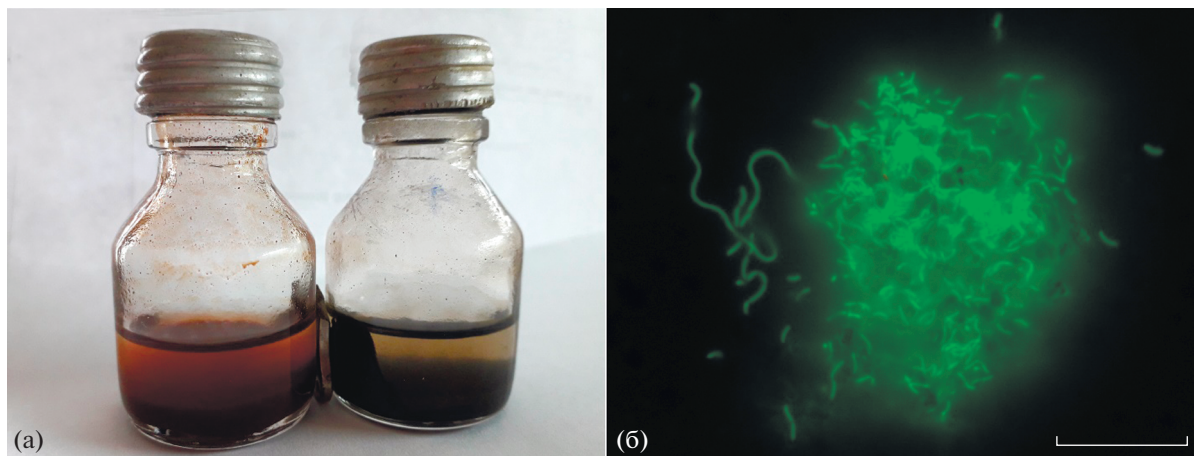
	Штамм Es71-Z0220 <sup>T</sup>	<i>Petrothermobacter organivorans</i> , штамм ANA <sup>T</sup> [Tamazawa et al., 2017]	<i>Calditerrivibrio nitroreducens</i> , штамм Yu137-1 <sup>T</sup> [Merkel et al., 2021]	<i>Flexistipes sinusarabici</i> штамм MAS 10 <sup>T</sup> [Slobodkin et al., 2019]	<i>Deferribacter thermophilus</i> , штамм ВМА <sup>T</sup> [Sohm et al., 2011]	<i>Denitrovibrio acetiphilus</i> штамм N2460 <sup>T</sup> [Starwalt-Lee et al., 2021]	<i>Geovibrio ferrireducens</i> , штамм PAI-1 <sup>T</sup> [Stookey, 1970]	<i>Mucispirillum schaedleri</i> , штамм HRI 117 <sup>T</sup> [Tatusova et al., 2016]
Морфология	Вибрионы	Слегка изогнутые палочки	Вибрионы	От прямых до сильно изогнутых, гибких палочек	Прямые или изогнутые палочки	Вибрионы	Вибрионы	Изогнутые или спиральные палочки
Длина клеток, мкм	3–5	1.5–5.0	2	5–50	1–5	2	2–6	4
Температурный диапазон роста (оптимум), °С	25–54 (45–50)	25–60 (55)	30–65 (55)	30–53 (45–50)	50–65 (60)	4–40 (35–37)	Up to 50 (35)	Up to 47 (37)
pH-диапазон роста (оптимум)	6–8.2 (7.1)	6.0–8.0 (7.0)	5.5–8.0 (7.0–7.5)	6.0–8.0	5.0–8.0 (6.5)	6.5–8.6	Н.о.	Н.о.
NaCl, конц. пределы роста (оптимум), %	0–1.8 (0.7)	0–6.0 (2.5)	0–0.5 (0)	3–18	0–5.0	0–6 (3–4)	0–2 (0.5)	0
Толерантность к кислороду	–	Н.о.	–	–	+	–	–	–
Акцепторы электронов:								
Fe(III) гидроксид***	+	+	–	Н.о.	+	Н.о.	+	Н.о.
Mn(IV) оксид	(+)	+	–	Н.о.	+	Н.о.	–	Н.о.
элементная сера	(+)	–	–	(+)	–	–	+	Н.о.
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	–	+	–	Н.о.	–	–	–	Н.о.
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	–	–	–	Н.о.	–	–	–	Н.о.
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	+	+	+	Н.о.	+	+	–	–
O <sub>2</sub>	–	–	–	–	–	–	–	Н.о.
фумарат	+	Н.о.	–	Н.о.	–	Н.о.	–	Н.о.
Доноры электронов:								
формиаг	–	–	–	Н.о.	–	–	–	Н.о.
ацетат	+	+	+	(+)	+	+	+	Н.о.
лактаг	+	+	+	Н.о.	+	–	+	Н.о.
сукцинат	+	–	+	Н.о.	+	Н.о.	+	Н.о.
пируват	+	+	+	Н.о.	+	–	+	Н.о.
этанол	–	–	–	Н.о.	–	–	–	Н.о.



Таблица 2. Окончание

	Штамм Es71-Z0220 <sup>T</sup>	<i>Petrothermobacter organivorans</i> , штамм ANA <sup>T</sup> [Tamura et al., 2017]	<i>Calditerrivibrio nitroreducens</i> , штамм Yu37-1 <sup>T</sup> [Merkel et al., 2021]	<i>Flexistipes sinusarabici</i> штамм MAS 10 <sup>T</sup> [Slobodkin et al., 2019]	<i>Deferribacter thermophilus</i> , штамм BMA <sup>T</sup> [Sohm et al., 2011]	<i>Denitrovibrio acetiphilus</i> штамм N2460 <sup>T</sup> [Starwalt-Lee et al., 2021]	<i>Geovibrio ferrireducens</i> , штамм PAI-1 <sup>T</sup> [Stookey, 1970]	<i>Mucispirillum schaedleri</i> , штамм HRI 117 <sup>T</sup> [Tatusova et al., 2016]
дрожжевой экстракт	–	+	+	+	+	–	+	H.o.
пептон	–	–	+	+	+	–		H.o.
казеиновые кислоты	–	–	+	(+)	+	–	+	H.o.
H <sub>2</sub>	–	–	–	H.o.	+	–	+	H.o.
Хемолитовотрофный рост	–	–	–	–	+	–	+	H.o.
Брожение	–	+	–	+	–	+	–	+**
Минимальное время удвоения, ч	3	H.o.	NT	H.o.	H.o.	8	H.o.	
Содержание ГЦ ДНК, мол. %	34.0	34.3	35.1	38.6	34.0	42.6	42.8	
Основные жирные кислоты (≥5%)	9C-C <sub>14:0</sub> , C <sub>16:0</sub> , C <sub>18:0</sub> , <i>изо</i> -C <sub>14:0</sub> , 14C-15:0	C <sub>18:0</sub> , <i>изо</i> -C <sub>18:0</sub> , C <sub>16:0</sub> , 10-метил C <sub>18:0</sub> , <i>анти</i> <i>изо</i> - C <sub>15:0</sub> , <i>анти</i> <i>изо</i> - C <sub>17:0</sub> , <i>изо</i> -C <sub>16:0</sub>	<i>изо</i> -C <sub>14:0</sub> , <i>анти</i> - <i>изо</i> -C <sub>15:0</sub> , C <sub>16:0</sub> , C <sub>18:0</sub> , <i>изо</i> -C <sub>13:0</sub> , <i>анти</i> <i>изо</i> -C <sub>13:0</sub> , <i>изо</i> -C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:0</sub> , C <sub>16:0</sub> , C <sub>17:0</sub> , <i>изо</i> -C <sub>14:0</sub> , <i>анти</i> - <i>изо</i> -C <sub>15:0</sub>	H.o.	C <sub>16:0</sub> , C <sub>16:1ω9</sub> , C <sub>18:1ω7</sub>	H.o.	H.o.
Основные хиноны	МК-8	МК-7(Н8) МК-8	МК-8	H.o.	H.o.	H.o.	H.o.	H.o.
Источник выделения	Thermal subsurface mineral water of Yessentuki deposit, Russia	High-tempera- ture deep subsur- face oil reservoir in Yabase oil field, Japan	Hot spring water from Yumata, Nagano, Japan	Brine water sam- ples of the Atlantis II Deep basin of the Red Sea at a depth of 2000 m	Produced water from the Beatrice petroleum reser- voir in the North Sea	H <sub>2</sub> S-producing oil reservoir model column flooded by nitrate- enriched syn- thetic seawater	Surface sediments of a ditch in Nor- man, Oklahoma, USA	Gastrointestinal mucus of rodents

Примечание. H.o. – не определяли; (+) – слабый рост; +\* – рост в присутствии 3% O<sub>2</sub>, при условии добавления Fe(III), Mn(IV) или нитрата в качестве акцептора электронов; +\*\* – с 5% кровяного агара; \*\*\* – синтезированный или природный ферригидрит.



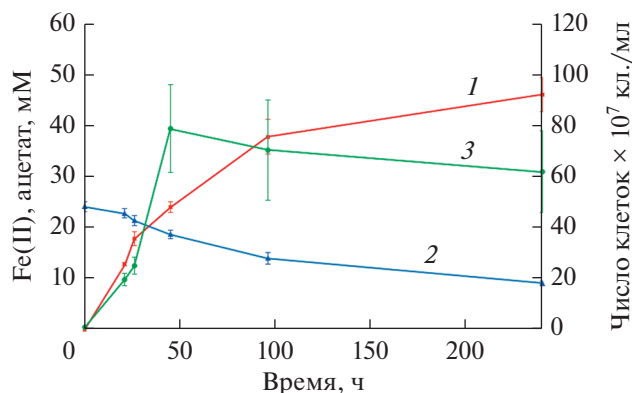
**Рис. 2.** Культура штамма Es71-Z0220<sup>T</sup>, выращенная на синтезированном ферригидрите: а – флаконы с культурой, флакон со стерильной средой и СФ (слева) и инкубированный флакон с СФ, преобразованным в черный магнитный осадок (справа), часть осадка собрана на стенке флакона из-за прикрепленного снаружи флакона неодимового магнита; б – флуоресцентная фотография окрашенной акридиновым оранжевым колонии, выросшей на частице СФ. Масштабная линейка – 10 мкм.

*rales Calditerrivibrio nitroreducens* и *Petrothermobacter organivorans* (Iino et al., 2008; Tamazawa et al., 2017). Биомасса штамма Es71-Z0220<sup>T</sup>, выращенная на fumarate или нитрате, или отмытая от крупных частиц магнетита, имела розовато-коричневатый цвет, что указывает на активную продукцию цитохромов. Суспензия клеток, выращенных на fumarate, на анаэробной среде (Б), имела пик светопоглощения при 405 нм, характерный для окисленных цитохромов *c*-типа (рис. 4). Добавление дитионита к суспензии вызывало появление пиков при 419, 522 и 552 нм на дифференциальном спектре восстановленного препарата против исходного, окисленного, что выявляет наличие в препарате восстановленных цитохромов *c*-типа. При дальнейшем добавлении растворимого цитрата железа(III) повторного

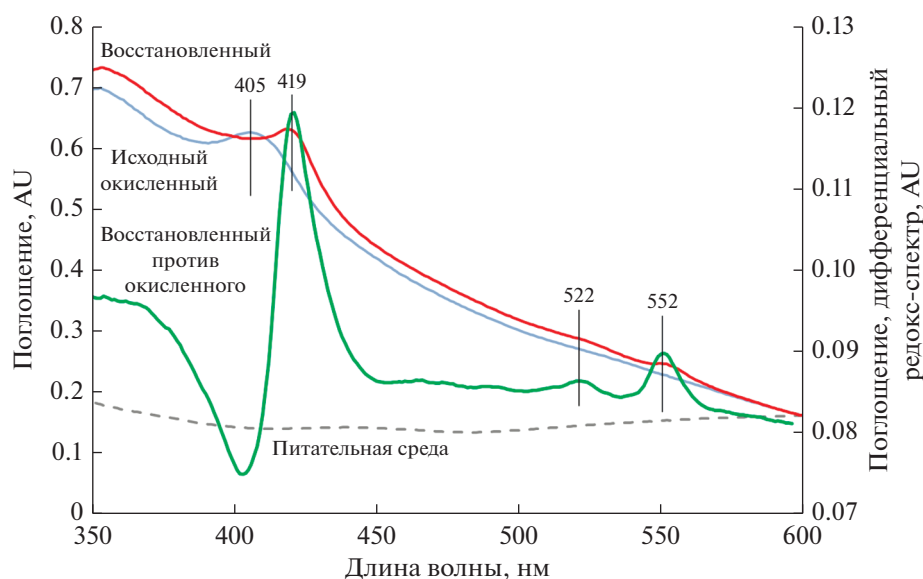
окисления цитохромов не наблюдалось, и в контрольной стерильной среде не было обнаружено никаких выраженных пиков светопоглощения.

**Секвенирование генома и филогенетический анализ.** Первичная сборка генома штамма Es71-Z0220<sup>T</sup> состояла из 65 контигов общим размером 2362387 п.о. с ГЦ-составом 34.04%. С помощью программного пакета NCBI PGAP в геноме было предсказано 2363 гена: 2293 белок-кодирующих последовательности, 47 генов РНК, включая 3 рРНК и 40 тРНК, и 23 псевдогена. Мы проанализировали геном на предмет филогенетического положения штамма Es71-Z0220<sup>T</sup>, его центрального углеродного и энергетического метаболизма, а также подвижности и предполагаемого хемотаксиса.

Штамм Es71-Z0220<sup>T</sup> имеет один оперон рРНК. Сравнение полной последовательности 16S рРНК с таковыми из базы данных GenBank (Benson et al., 1999) показало, что штамм Es71-Z0220<sup>T</sup> имеет отдаленное родство с семейством *Deferribacteraceae* и максимальную попарную идентичность с *Petrothermobacter organivorans* ANA<sup>T</sup> (94.05% сходства), а также с *Calditerrivibrio nitroreducens* DSM 19672<sup>T</sup> (89.64%) и *Deferribacter thermophilus* BMA1<sup>T</sup> (88.08%). Средняя идентичность аминокислотных последовательностей (AAI) *D. essentukiensis* и других секвенированных представителей *Deferribacterales* составила от 48 до 59% (рис. S4). Для прояснения таксономического положения штамма Es71-Z0220<sup>T</sup> была выполнена филогенетическая реконструкция на основе анализа конкатенированных частичных аминокислотных последовательностей 120-ти консервативных бактериальных белков (рис. 5). Этот анализ вы-



**Рис. 3.** Рост, образование Fe(II) и потребление ацетата культурой штамма Es71-Z0220<sup>T</sup> на среде с синтезированным ферригидритом: 1 – образование Fe(II); 2 – потребление ацетата; 3 – рост культуры.



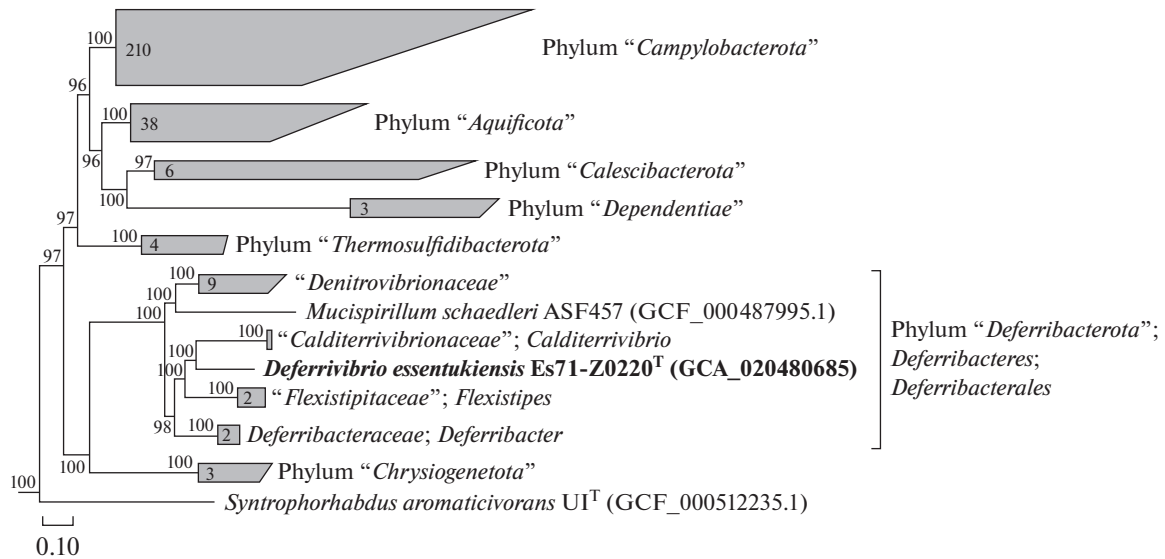
**Рис. 4.** Спектрофотометрическая характеристика цитохромов *c*-типа в суспензии целых клеток *D. essentukiensis* ES71-Z0220<sup>T</sup>. Представлены спектры нативных (окисленных) цитохромов *c*-типа и тех же цитохромов после их восстановления дитионитом натрия, а также дифференциальный (восстановленный против окисленного) спектр. Отмечены характерные пики поглощения окисленных (при 405 нм) и восстановленных (при 419, 522 и 552 нм) цитохромов *c*-типа. Пунктирная линия показывает фоновый спектр поглощения неинкулированной культуральной среды, инкубированной то же время, что и выросшая культура. Все спектры даны с коррекцией относительно фона. Спектры окисленных и восстановленных цитохромов, а также фонового контроля приведены к одному масштабу, а дифференциальный, восстановленный против окисленного, спектр (зеленая линия) дан в отдельном масштабе против вспомогательной оси *Y*. AU – единицы светопоглощения.

явил, что штамм Es71-Z0220<sup>T</sup> четко обособлен от других известных родов и семейств класса *Deferribacteres* и образует отдельную филогенетическую ветвь уровня семейства в порядке *Deferribacterales*. Учитывая эти результаты и основываясь на полногеномной таксономии GTDB (Parks et al., 2020), мы предлагаем новый вид и род для штамма Es71-Z0220<sup>T</sup> с названием *Deferrivibrio essentukiensis* gen. nov., sp. nov. в новом семействе. С учетом сравнительно высокой попарной идентичности последовательностей гена 16S рРНК штамма Es71-Z0220<sup>T</sup> и *Petrothermobacter organivorans* ANA<sup>T</sup> (94.05% сходства), мы предполагаем, что эти два микроорганизма могут принадлежать к одной филогенетической группе уровня семейства в порядке *Deferribacterales*, но, к сожалению, геном *P. organivorans* ANA<sup>T</sup> пока недоступен, что не позволяет проверить наше предположение.

### Геномный анализ

**Центральный метаболизм.** Протон-транслоцирующая НАДН-дегидрогеназа I типа (комплекс I дыхательной цепи) кодируется в геномном локусе LF845\_01775-01845 в следующем порядке: *nuoNMLKJIHGFEDCBA*. Дыхательный комплекс II (сукцинатдегидрогеназа/фумаратредуктаза) кодируется в локусе LF845\_01775-01845. Окислительное фосфорилирование у штамма ES71-Z0220<sup>T</sup> де-

терминируется генами типичной АТФ-синтетазы F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-типа, субъединицы которой кодируются двумя взаимно удаленными геномными кластерами. Гены цитоплазматических субъединиц ε, β, γ, α, δ и В локализованы в кластере LF845\_01490-01520, а гены субъединицы А мембранного статора и базового блока мембранного ротора (субъединицы С) входят в генный кластер LF845\_08945-08950 вместе с геном регуляторной субъединицы AtpZ, которая, предположительно, ингибирует дефосфорилирующую активность АТФ-азы в пользу синтеза АТФ (Mendoza-Hoffmann et al., 2018). Геном штамма ES71-Z0220<sup>T</sup> содержит ключевые гены метаболизма ацетата и пирувата – ацетил-КоА-синтазы (LF845\_04900) и пируваткарбоксилазы (LF845\_11100). Сукцинат и лактат, вероятно, метаболизируются у *D. essentukiensis* малат/L-лактатдегидрогеназой (LF845\_02525) и сукцинатдегидрогеназой (LF845\_02470-02490), входящих в пул ферментов ЦТК. Все остальные ключевые ферменты этого цикла кодируются рядом с этими дегидрогеназами в локусе LF845\_02495-02540, за исключением цитратсинтазы, кодируемой геном LF845\_10495. Транспорт углеродных субстратов в клетки *D. essentukiensis* детерминируется генами транспортеров пирувата и лактата семейства TRAP. LF845\_04590-04600 и LF845\_03890-03910, а также предполагаемыми симпортерами сукцината/ацетата и протонов LF845\_07175 и LF845\_06765.



**Рис. 5.** Таксономическое положение *D. essentukiensis* ES71-Z0220<sup>T</sup> внутри порядка *Deferribacterales* по результатам филогенетического анализа конкатенированных частичных аминокислотных последовательностей 120-ти консервативных бактериальных белков (Parks et al., 2020) методом максимального правдоподобия. Значения бутстрапов выше 90% указаны в узлах ветвлений. Масштабная линейка – 0.10-й аминокислотной замене в позиции. Названия таксонов приведены по базе GTDB (Parks et al., 2021).

**“Железное дыхание” (Fe(III) как акцептор электронов).** Скрининг генома *D. essentukiensis* выявил 18 генов, кодирующих разнообразные мультигемовые цитохромы *c*-типа с количеством гем-связывающих мотивов от 2 до 28 на одну белковую последовательность. Для всех этих мультигемовых белков предсказаны секрета через цитоматическую мембрану или закоривание на ее периплазматической стороне. Соответственно, любой из этих мультигемов может участвовать в процессе внеклеточного переноса электронов на нерастворимый акцептор, например, ферригидрит или другие минералы Fe(III). Десять из этих мультигемовых белков гомологичны компонентам путей ВПЭ, ранее охарактеризованным у железовосстанавливающих бактерий (Shi et al., 2016; Costa et al., 2019; Gavrilov et al., 2021) (табл. S2). Цитохромы LF845\_03595 и LF845\_05585 гомологичны филогенетически родственным между собой предполагаемым терминальным железоредуктазам *OswA* из “*T. potens*” и *OmhA* из *Carboxydotherrhus ferrireducens* (Costa et al., 2019; Gavrilov et al., 2021). Цитохромы LF845\_01595 и LF845\_09875 гомологичны октагемовому *SmhA* из *C. ferrireducens*, а LF845\_05580 гомологичен гептагемовому цитохрому Ga0395992\_02\_30996\_31874 из того же организма. Экспрессия обоих гомологов из *C. ferrireducens* повышается при росте с нерастворимыми акцепторами электронов (Gavrilov et al., 2021). Цитохромы LF845\_05495 и LF845\_05525, предположительно закоренные на мембране *D. essentukiensis*, имеют схожий невысокий уровень гомологии с внешне-мембранным цитохромом *OmcE* *G. sulfurreducens* (Shi

et al., 2016). Цитохром LF845\_05545 гомологичен периплазматическому переносчику электронов *DmsE* из *S. oneidensis*, а наиболее крупные цитохромы *D. essentukiensis* (15-гемовый LF845\_05555 и 28-гемовый LF845\_05560) гомологичны периплазматическому декагему *MtrA*, являющемуся частью порин-цитохромового комплекса *S. oneidensis*, обеспечивающего ВПЭ у данного организма (Schickberger et al., 2013). Восемь из вышеупомянутых мультигемовых цитохромов *D. essentukiensis*, предположительно имеющих отношение к ВПЭ, кодированы ко-локализованными генами в локусе LF845\_05495-05585 вместе с еще двумя цитохромами. Пять цитохромов, кодированных в локусе LF845\_05495-05585, содержат предполагаемые гематит-связывающие мотивы ТРТ, SPT и TVTPS (Lower et al., 2008). В аминокислотных последовательностях белков LF845\_05585 и LF845\_05545 такие мотивы фланкированы гем-связывающими сайтами. Детальные характеристики идентифицированных мультигемовых цитохромов приведены в табл. S2. “Цитохромовый локус” *D. essentukiensis* кодирует также предполагаемый менахинол-окисляющий белок, содержащий домен цитохрома *b/b*<sub>6</sub>, LF845\_05575, и белок, содержащий NHL-повторы, LF845\_05565. Blast-анализ идентифицированных нами генов *D. essentukiensis*, имеющих отношение к ВПЭ, против таковых, ранее описанных у *Deferribacter autotrophicus* и *D. desulfuricans* (Slobodkin et al., 2019), выявил значимую гомологию между мультигемовыми цитохромами всех этих трех микроорганизмов порядка *Deferribacterales*. Более того, мы обнаружили,

что локализация генов в “цитохромовом локусе” *Deferrivibrio essentukiensis* практически идентична локализации их гомологов в “цитохромовых” генных кластерах *Deferribacter autotrophicus* и *D. desulfuricans* (Slobodkin et al., 2019). Интересно, что только у железоредуцирующих микроорганизмов *Deferrivibrio essentukiensis* и *Deferribacter autotrophicus* были обнаружены гомологи цитохрома SmhA *C. ferrireducens* (LF845\_01595 и LF845\_09875 у *D. essentukiensis*). Мы не обнаружили значимой гомологии какого-либо из этих белков, или ShmA, с каким-либо мультигеновым цитохромом *Deferribacter desulfuricans*, не способного к железоредукции.

**Нитратное и серное дыхание.** *Deferrivibrio essentukiensis* обладает генным кластером, кодирующим белки нитрат-восстанавливающей системы Nap в последовательности NapHGDA (LF845\_02950-02965). Предполагаемый редокс-партнер периплазматической молибдоптеринового нитратредуктазы NapA, тетрагеновый цитохром NapM, кодируется рядом с этим кластером (LF845\_02970), а гомолог менахинон-окисляющего мембраносвязанного цитохрома семейства NapC/NrfH кодируется отдельно локализованным геном (LF845\_08935). В геноме *D. essentukiensis* отсутствуют гены аммоний-образующего нитритредуктазного комплекса NrfAH, однако присутствует ген гидроксиламиноксидоредуктазы группы εNao с восемью гемами типа c (Simon, Klotz, 2013), локализованный по соседству с “Nap-локусом” (LF845\_02975). Штамм ES71-Z0220<sup>T</sup> обладает также генами нескольких каталитических субъединиц каталитических субъединиц молибдоптеринового оксидоредуктазного комплексов, один из которых имеет наибольшее сходство с белками подсемейства полисульфид/тиосульфат-редуктаз и кодируется в локусе LF845\_11445-11455 рядом с типичными железосерной и мембраносвязанной субъединицами оксидоредуктаз семейства CISM (Rothery et al., 2008).

**Гены, детерминирующие кислородное дыхание или устойчивость к кислороду.** *D. essentukiensis* обладает опероном, кодирующим медную цитохром c-оксидазу cbb<sub>3</sub>-типа (LF845\_03180-03210). Однако гены каких-либо редокс-партнеров терминальных цитохром c-оксидаз, в частности, канонического или альтернативного комплексов III, отсутствуют в геноме *D. essentukiensis*. Также в геноме не были детектированы гены каталазы.

**Подвижность и хемотаксис.** *D. essentukiensis* обладает полным набором генов, детерминирующим жгутиковый аппарат и хемотаксис. Гены жгутикового аппарата локализованы в нескольких кластерах: локус LF845\_00175-00225 кодирует основные белки базального тела, оси и крюка жгутика, локус LF845\_02070-02105 кодирует белки системы секреции III типа и некоторые другие биосинтеза жгутика, локус LF845\_07640-07685

также кодирует белки биосинтеза жгутика, включая протон-зависимый статор MotAB и переключатель направления вращения FliM. Интересно, что гены филамента жгутика *fliCDST* удалены в геноме от вышеупомянутых локусов, в том числе, основной флагеллин FliC кодирован отдельно локализованным геном (LF845\_07440). Гены, обуславливающие таксис, гомологичные ранее описанным детерминантам предполагаемого редокс-зависимого хемотаксиса железовосстанавливающих видов рода *Shewanella* (Starwalt-Lee et al., 2021), сгруппированы в локусе LF845\_06375-06460 генома *D. essentukiensis*. Этот набор генов кодирует гистидинкиназу CheA (LF845\_06410) и регуляторные белки CheBRYZ, которые, как предполагается, передают сигнал от активированных метилируемых белков хемотаксиса (MCP-рецепторов) на переключатель направления вращения жгутика FliM (LF845\_06430). Кроме того, в этом локусе кодируется сигма-фактор FliA, контролирующей экспрессию генов жгутикового аппарата. Несколько белков MCP-рецепторов и белок CheW (LF845\_04070), поддерживающий структуру олигомеров этих рецепторов, кодируются генами, удаленными от “локуса хемотаксиса”.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Порядок *Deferribacterales* (Huber et al., 2001) филума *Deferribacterota* (Whitman et al., 2018) в настоящее время включает в себя одно валидно описанное семейство *Deferribacteraceae*, состоящее из восьми родов: *Calditerrivibrio* (Iino et al., 2008), *Flexistipes* (Fiala et al., 1990), *Deferribacter* (Greene et al., 1997), *Denitrovibrio* (Myhr, Torsvik, 2000), *Petrothermobacter* (Tamazawa et al., 2017), *Geovibrio* (Caccavo et al., 1996), *Seleniivibrio* (Rauschenbach et al., 2013) и *Mucispirillum* (Robertson et al., 2005). Однако согласно филогении GTDB, основанной на анализе полногеномных последовательностей, порядок включает 4 семейства, в которые не входит род *Mucispirillum*, образующий ветвь, отдельную от других известных родов данного порядка (рис. 5). За исключением *M. schaedleri*, который был выделен из желудочно-кишечной слизи мышей, все представители этого порядка являются свободноживущими бактериями, выделенными из природных термальных вод, нефтяных месторождений, глубоководных морских осадков. Большинство этих бактерий является строго анаэробными, галотолерантными, умеренно термофильными и нейтрофильными грамотрицательными вибрионами с дыхательным типом метаболизма. Все представители порядка *Deferribacterales*, за исключением бродильщика *F. sinusarabici*, могут использовать ацетат и широкий спектр других органических кислот, а также пептиды, аминокислоты и спирты в качестве доноров электронов. Типичными акцепторами электронов для этих



бактерий являются Fe(III) в растворимой или нерастворимой форме, Mn(IV), элементная сера, или нитрат. Среди представителей порядка только *P. organivorans* способен восстанавливать сульфат (Tamazawa et al., 2017). Представители родов *Deferribacter* и *Geovibrio* могут окислять молекулярный водород при росте без органического углерода, являясь, таким образом, хемолитоавтотрофами. Фенотипические характеристики штамма Es71-Z0220<sup>T</sup> в целом соответствуют описанному у большинства культивируемых *Deferribacterales* (табл. 2). Новый штамм Es71-Z0220<sup>T</sup> является строго анаэробным, умеренно термофильным, нейтрофильным галотолерантным грамотрицательным вибрионом, способным к диссимиляционному восстановлению ферригидрата, нитрата, фумарата и элементной серы с ацетатом или другими органическими кислотами в качестве доноров электронов. Оптимальные физико-химические условия его роста полностью соответствуют характеристикам минеральной воды типа “Ессентуки № 4”. Особенностью штамма Es71-Z0220<sup>T</sup> является его неспособность восстанавливать растворимые соединения Fe(III), что коррелирует с отсутствием окислительно-восстановительного взаимодействия между его цитохромами *c*-типа и цитратным комплексом Fe(III) (рис. 4). Такая физиологическая особенность может отражать адаптацию этого железоредуцирующего микроорганизма к жизни в порах и трещинах водовмещающих осадочных пород водоносного горизонта, в котором растворимость железа чрезвычайно низка, а нерастворимые минералы представляют собой наиболее распространенную форму Fe(III), доступную для анаэробного дыхания. Мультигеновые цитохромы *c*-типа являются наиболее вероятными детерминантами железовосстанавливающей активности штамма Es71-Z0220<sup>T</sup>, аналогично большинству описанных в настоящее время железоредуцирующих прокариот (Faustino et al., 2021; Gavrillov et al., 2021). Организм обладает набором генов 18 мультигеновых цитохромов *c*-типа, 11 из которых локализованы в геноме. Семь белков, кодируемых в этом “цитохромовом локусе”, предположительно являются секретлируемыми или мембранно-связанными цитохромами, ориентированными в периплазму, и имеют значимую гомологию с ранее описанными детерминантами путей ВПЭ. Аминокислотные последовательности пяти из этих цитохромов содержат предполагаемые гематит-связывающие мотивы, некоторые из которых фланкированы гем-связывающими сайтами, как во внешнемембранном цитохроме MtrC, обеспечивающем восстановление Fe(III) у *S. oneidensis* (Lower et al., 2008). Мультигеновые белки с такими мотивами являются наиболее вероятными терминальными железоредуктазами. “Цитохромовый локус” *D. essentukiensis* также кодирует предполагаемый менахинол-

окисляющий цитохром *b/b<sub>6</sub>* и белок, содержащий NHL-повторы, который может связывать нанокристаллы минералов переходных металлов (Voet et al., 2015). Соответственно, локус LF845\_05495-05585, вероятно, является важной детерминантой пути переноса электронов от хинонового пула к внеклеточным акцепторам электронов у *D. essentukiensis*. Предполагаемые терминальные редуктазы этого пути, вероятно, имеют высокое родство к нерастворимым формам Fe(III), аналогично ранее описанным цитохромам облигатного железоредуктора *Geoglobus acetivorans* (Mardanov et al., 2015). Однако следует отметить, что “цитохромовый локус” сам по себе не определяет способность *D. essentukiensis* к ВПЭ. Генные кластеры, содержащие гомологи всех вышеописанных белков этого локуса, с подобной ему организацией генов были ранее обнаружены у двух, различных по своей физиологии, представителей порядка *Deferribacterales* – у железоредуктора *Deferribacter autotrophicus* и у *D. desulfuricans*, не способного к восстановлению Fe(III) (Slobodkin et al., 2019). Наш сравнительный анализ наборов мультигеновых цитохромов этих двух организмов и *Deferrivibrio essentukiensis* выявил, что только железоредукторы *D. autotrophicus* и *Deferrivibrio essentukiensis* обладают гомологами восьмигенового цитохрома SmhA *C. ferrireducens*. Ранее нами было показано существенное увеличение экспрессии этого цитохрома в присутствии нерастворимых акцепторов электронов у *C. ferrireducens*, а также его филогенетическое родство с восьмигеновым цитохромом FHQ18\_RS08740 (WP\_149266789.1) *Deferribacter autotrophicus* (Gavrillov et al., 2021). Таким образом, именно гомологи SmhA могут являться ключевыми детерминантами железоредукции у различных представителей *Deferribacterales*.

Путь нитратредукции у *Deferrivibrio essentukiensis* схож с выявленными ранее у нескольких аммонифицирующих бактерий филума *Deferribacteres* (Slobodkin et al., 2019). В геноме *D. essentukiensis* присутствуют гены нитратредуцирующего комплекса Nar. Однако вместо архетипического комплекса аммонифицирующей нитритредуктазы NrfAN, *D. essentukiensis* обладает восьмигеновой гидроксиламиноксидоредуктазой из филогенетической группы εНао. Ранее для цитохромов этой группы уже предполагалась ключевая роль в восстановлении нитрита в аммоний в отсутствие NrfAN у эпсилонпротеобактерий (Simon, Klotz, 2013) и бактерий филума *Calditrichaeota* (Kublanov et al., 2017).

Геномные детерминанты центрального углеродного и энергетического метаболизма, а также пути утилизации органических субстратов у *D. essentukiensis* довольно типичны для строго анаэробных хемоорганогетеротрофов. Организм обладает протон-транслоцирующим комплексом I и комплексом II фумаратредуктазы дыхательной

цепи переноса электронов, архетипической АТФ-синтазой типа  $F_0F_1$ , несколькими трансмембранными хинол-окисляющими Fe-S- и гем-содержащими белками, такими, как цитохром *b/b<sub>6</sub>*, субъединица *PsrC* предполагаемого полисульфидредуктазного комплекса, белки *NarC* и *NarH*, которые могут сопрягать генерацию протон-движущей силы с восстановлением Fe(III), серы и нитрата соответственно. В геноме *D. essentukiensis* закодированы все необходимые транспортеры ключевых углеродных субстратов и доноров электронов (ацетата, пирувата, сукцината и лактата), а также ферменты, необходимые для окисления этих субстратов и их использования в качестве источников энергии через ЦТК.

Интересно, что геном этого организма кодирует цитохромоксидазу *cbb<sub>3</sub>*-типа, которая, как предполагается, обеспечивает кислородное дыхание в условиях микроаэробного роста (Pitcher et al., 2002). В этой связи, неспособность *D. essentukiensis* к микроаэробному или аэробному росту может быть объяснена отсутствием генов дыхательного комплекса III, которые необходимы для кислородного дыхания.

Суммируя метаболические особенности *D. essentukiensis*, можно предположить его экологическую роль в подземной экосистеме водовмещающих пород исследуемого водоносного горизонта как микроорганизма, сопрягающего окисление органических веществ с восстановительной трансформацией минералов Fe(III). С другой стороны, если учесть крайне низкую представленность фило-типов, связанных с *Deferribacterales*, в исследованных образцах минеральной воды, экологическая значимость *D. essentukiensis* представляется сомнительной. С этой точки зрения, новый вид, скорее, можно отнести к так называемой “редкой биосфере”. Феномен “редкой биосферы” объединяет небольшие субпопуляции прокариот, каждая из которых составляет менее 1% библиотеки генов 16S рРНК микробного сообщества, в единую экологически значимую единицу (Скопина и соавт., 2016; Jousset et al., 2017). На сегодняшний день считается, что такие минорные группы микроорганизмов служат источником генетического материала для микробного сообщества, активизирующегося при резких изменениях условий окружающей среды (Jousset et al., 2017), являются первыми обитателями вновь возникших или полностью измененных экологических ниш (Скопина и соавт., 2016), а также поддерживают содержание важных факторов роста, таких как витамины или органический азот, на низком, но критически необходимом уровне (Sohm et al., 2011; Zhang et al., 2019).

Альтернативное объяснение низкой представленности *D. essentukiensis* в микробном сообществе заключается в возможном неравномерном вымывании микроорганизмов из пор водовмещающих по-

род при бурении и добыче минеральной воды. Это особенно существенно при изучении организмов, которые зависят от нерастворимых субстратов, таких как минералы Fe(III), и, вероятно, образуют биопленки на минеральных поверхностях. Мы действительно наблюдали плотные колонии клеток *D. essentukiensis*, выращенных с использованием СФ (рис. 26). С этой точки зрения, подвижность организма, обеспечиваемая жгутиком, может отражать его способность к редокс-чувствительному хемотаксису, включая возможную миграцию к нерастворимым акцепторам электронов, которая широко изучается в последнее десятилетие у диссимиляционных металлоредукторов и электрогенных бактерий (Starwalt-Lee et al., 2021). Гипотетическая способность *D. essentukiensis* ориентироваться по направлению движения к нерастворимым акцепторам электронов коррелирует с тем фактом, что его гены, связанные с хемотаксисом и сгруппированные в локусе LF845\_06375-06460, гомологичны генам, недавно идентифицированным у железовосстанавливающих и электрогенных бактерий рода *Shewanella* (Starwalt-Lee et al., 2021). Выделение нами второго железоредуцирующего штамма *D. essentukiensis* Es71N из воды того же водоносного горизонта, отобранной через резервную скважину 71Н после девятимесячного перерыва, указывает на устойчивость этого вида в исследуемой экосистеме. Этот факт делает равновероятными оба упомянутых предположения: 1) гипотезу о широком распространении *D. essentukiensis* в верхнемеловом водоносном горизонте и его неравномерном вымывании из биопленок, покрывающих водовмещающие породы, и 2) предположение о принадлежности *D. essentukiensis* к “редкой биосфере”, представители которой могут быстро наращивать свою численность, опережая других членов микробного сообщества, при благоприятных изменениях физико-химических условий. Очевидно, что необходимы дальнейшие исследования для выяснения экологической роли нового изолята в природной среде и определения точного влияния его метаболической активности на формирование состава минеральных вод ЕММВ.

На основании физиологических свойств и филогенетического анализа мы предлагаем штамм ES71-Z0220<sup>T</sup> в качестве типового штамма нового вида и рода под названием *Deferrivibrio essentukiensis* gen. nov., sp. nov., являющегося первым представителем нового семейства *Deferrivibrionaceae* fam. nov.

#### Описание *Deferrivibrionaceae* fam. nov.

*Deferrivibrionaceae* (De.fer.ri.vi.bri.o.na.ce'ae, нео-лат., от сущ. муж. р. *Deferrivibrio* – типовой род семейства; лат. суфф. множ. ч. жен. р. -*aceae*, окончание для обозначения семейства), нео-лат., сущ.



множ. ч. жен. р. *Deferrivibrionaceae*, семейство *Deferrivibrio*.

Семейство образовано на основе филогенетического анализа 120-ти консервативных бактериальных маркерных генов, а также морфо-физиологических характеристик. Клетки представителя семейства являются грамотрицательными вибрионами, не образующими спор. Семейство включает в себя анаэробные хемоорганотрофные виды. Типовой род – *Deferrivibrio* gen. nov.

#### Описание *Deferrivibrio* gen. nov.

*Deferrivibrio* (De.fer.ri.vi'bri.o., лат. прист. *de* от лат. суш. ср. р. *ferrum*, железо; лат. гл. *vibrare*, вибрировать; нео-лат. суш. муж. р. *vibrio*), название бактерий, имеющих изогнутую форму клетки; нео-лат. суш. муж. р. *Deferrivibrio*, вибрион, восстанавливающий железо.

Клетки представляют собой подвижные неспорообразующие грамотрицательные вибрионы. Анаэробы, каталазо- и оксидазо-положительные. Нейтрофилы и термофилы. Хемоорганотрофные организмы, преимущественно окисляющие органические кислоты. Способны к восстановлению окисного железа, нитратов и серы. Клеточные жирные кислоты являются, в основном, 14-18-углеродсодержащими, насыщенными, с длинной и (или) разветвленной цепью. Основным изопреноидным менахиноном является МК-8.

Типовой вид – *Deferrivibrio essentukiensis* sp. nov.

#### Описание *Deferrivibrio essentukiensis* sp. nov.

*essentukiensis* (es.sen.tu.ki.en'sis., нео-лат. прил. муж. р. *essentukiensis*, от “Ессентуки”), назван по названию места происхождения – Ессентукского месторождения минеральных вод, Россия.

Клетки неспорообразующие, подвижные посредством одного полярного жгутика, вибрионы, 0.4–0.5 мкм в толщину и 1–3 мкм в длину. Клеточная стенка грамотрицательного типа. Умеренный термофил, температура роста в пределах от 30 до 54°C, с оптимумом при 47°C. Нейтрофил, рН роста варьирует в пределах от 6.2 до 7.9, с оптимумом при рН 7.1. Галотолерантный организм, растущий при концентрации NaCl от 0 до 18 г/л, с оптимумом при 7 г/л. Каталазо- и оксидазо-положительный анаэроб. Хемоорганотроф, способен расти, используя ацетат, лактат, пируват или сукцинат в качестве доноров электронов с ферригидритом в качестве акцептора электронов. Не способен окислять молекулярный водород, метанол, этанол, н-пропанол, бутанол, формиат, малат, цитрат, микрокристаллическую и карбоксиметилцеллюлозу, крахмал, пектин, дрожжевой или мясной экстракты, триптон, казаминовые кислоты с ферригидритом в качестве акцептора электронов.

Не способен к сбраживанию пептона, дрожжевого или мясного экстрактов, триптона, целлобиозы, глюкозы или сахарозы. С ацетатом в качестве донора электронов восстанавливает фумарат, нитрат и элементную серу, но не АХДС, Fe(III)-цитрат, Fe(III)-ЭДТА, тиосульфат, сульфат, сульфит, диметилсульфоксид, нитрит, селенат или кротонат. Основными жирными кислотами являются 9C-C<sub>14:0</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:0</sub>, *изо*-C<sub>14:0</sub>, 14C-C<sub>15:0</sub>. Основным изопреноидным менахиноном является МК-8. Устойчив к канамицину, высокочувствителен к рифампицину, ингибирующему ДНК-зависимую РНК-полимеразу, менее чувствителен к ингибиторам рибосомального биосинтеза белка и биосинтеза клеточной стенки. Типовым штаммом является Es71-Z0220<sup>T</sup> (=VKM B-3557 = JCM 39245), выделенный из подземной минеральной воды верхнемелового водоносного горизонта Ессентукского месторождения минеральных вод.

Все результаты секвенирования депонированы в NCBI BioProject PRJNA753547.

Статья содержит дополнительные материалы: табл. S1 и S2, рис. S1, S2, S3.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность недропользователю ЕММВ ООО “Холдинг-Аква” за предоставление доступа к эксплуатационным скважинам месторождения.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена при поддержке проекта РНФ № 21-14-00333 (пробоотбор 2021 года, выделение и физиологическая характеристика чистых культур, гидрогеологический анализ, секвенирование и геномный анализ, подготовка публикации). Кроме того, работы ДГЗ, МИП, ААК, АЮМ, СНГ по отбору проб в 2020 году и выделению ДНК были проведены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Абрамов В.Ю., Вавичкин А.Ю. Особенности формирования термогазохимического состава минеральных вод Ессентукского месторождения // Разведка и охрана недр. 2010. № 10. С. 27–32.

- Заварзина Д.Г., Колганова Т.В., Булыгина Е.С., Кострикина Н.А., Турова Т.Н., Заварзин Г.А. *Geokalibacter ferrihydriticus* gen. nov., sp. nov., первый алкалофильный представитель семейства *Geobacteraceae*, выделенный из содового озера // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 775–785.
- Zavarzina D.G., Kolganova T.V., Boulygina E.S., Kostrikin N.A., Tourouva 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.
- Кевбрин В.В., Заварзин Г.А. Влияние соединений серы на рост галофильной гомоацетатной бактерии *Acetohalobium arabaticum* // Микробиология. 1992. Т. 61. С. 812–817.
- 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.
- 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. 655–664.
- Merkel A.Y., Tarnovetskii I.Y., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 671–680.
- Потапов Е.Г., Дубинина Г.А., Данилов С.Р., Гаджиханова С.У., Щелкунов А.В., Грабович М.Ю. Физико-химические и микробиологические исследования подземных минеральных вод района КМВ // Курортная медицина. 2014. № 4. С. 14–20.
- Потапов Е.Г., Данилов С.Р., Гаджиханова С.У. Генезис углекисло-сероводородных минеральных вод Эссентукского месторождения по данным гидрохимических, микробиологических и изотопных исследований // Курортная медицина. 2017. № 1. С. 11–16.
- Скопина М.Ю., Васильева А.А., Перишина Е.В., Пиневиц А.В. Разнообразие малочисленности: феномен “Разреженной бактериальной биосферы” // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 248–260.
- Skopina M.Yu., Vasileva A.A., Pershina E.V., Pinevich A.V. Diversity at low abundance: the phenomenon of the Rare Bacterial Biosphere // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 272–282.
- Aklujkar M., Coppi M.V., Leang C., Kim B.C., Chavan M.A., Perpetua L., Giloteaux L., Liu A., Holmes D.E. Proteins involved in electron transfer to Fe(III) and Mn(IV) oxides by *Geobacter sulfurreducens* and *Geobacter uraniireducens* // Microbiology (SGM). 2013. V. 159. P. 515–535.
- Anisimova M., Gascuel O. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative // Syst. Biol. 2006. V. 55. P. 539–552.
- Benson D., Boguski M., Lipman D., Ostell J., Ouellette B., Rapp B.A., Wheeler D.L. GenBank // Nucl. Acids Res. 1999. V. 27. P. 38–43.
- Butler J.E., Young N.D., Lovley D.R. Evolution of electron transfer out of the cell: comparative genomics of six *Geobacter* genomes // BMC Genomics. 2010. V. 11. P. 40.
- Caccavo F.J., Coates J.D., Rossello-Mora R.A., Ludwig W., Schleifer K.H., Lovley D.R., McInerney M.J. *Geovibrio ferrireducens*, a phylogenetically distinct dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium // Arch. Microbiol. 1996. V. 165. P. 370–376.
- Cappuccino J.G., Sherman N. Microbiology: A Laboratory Manual, 6th ed. San Francisco: Benjamin 302 Cummings Pearson Education, 2002.
- Carlson H.K., Iavarone A.T., Gorur A., Yeo B.S., Tran R., Melnyk R.A., Mathies R.A., Auer M., Coates J.D. Surface multiheme c-type cytochromes from *Thermincola potens* and implications for respiratory metal reduction by Gram-positive bacteria // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 1702–1707.
- Collins M.D., Jones D. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications // Microbiol. Rev. 1981. V. 15. P. 316–354.
- Collins M.D. Analysis of isoprenoid quinones // Methods Microbiol. 1985. V. 18. P. 329–363.
- Costa N.L., Hermann B., Fourmond V., Faustino M.M., Teixeira M., Einsle O., Paquete C.M., Louro R.O. How thermophilic Gram-positive organisms perform extracellular electron transfer: characterization of the cell surface terminal reductase OcwA // mBio. 2019. V. 10. e01210-19.
- Coursolle D., Gralnick J.A. Modularity of the Mtr respiratory pathway of *Shewanella oneidensis* strain MR-1 // Mol. Microbiol. 2010. V. 77. P. 995–1008.
- Faustino M.M., Fonseca B.M., Costa N.L., Lousa D., Louro R.O., Paquete C.M. Crossing the wall: characterization of the multiheme cytochromes involved in the extracellular electron transfer pathway of *Thermincola ferriacetica* // Microorganisms. 2021. V. 9. Art. 293.
- Fiala G., Woese C.R., Langworthy T.A., Stetter K.O. *Flexistipes sinusarabici*, a novel genus and species of eubacteria occurring in the Atlantis II Deep brines of the Red Sea // Arch. Microbiol. 1990. V. 154. P. 120–126.
- Filimonova E., Kharitonova N., Sartykov A., Maximova E., Baranovskaya E., Korzun A., Maslov A., Baidariko E., Lavrushin V. Hydrogeology and hydrogeochemistry of mineral sparkling groundwater within Yessentuki area (Caucasian mineral water region) // Environ. Earth Sci. 2020. V. 79. P. 15.
- Gavrilov S.N., Zavarzina D.G., Elizarov I.M., Tikhonova T.V., Dergousova N.I., Popov O., Lloyd J.R., Knight D., El-Naggar M.Y., Pirbadian S., Leung K.M., Robb F.T., Zakhartsev M.V., Bretschger O., Bonch-Osmolovskaya E.A. Novel extracellular electron transfer channels in a Gram-positive thermophilic bacterium // Front. Microbiol. 2021. V. 11. Art. 3349.
- 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>
- Greene A.C., Patel B.K., Sheehy A.J. *Deferribacter thermophiles* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic manganese- and iron-reducing bacterium isolated from a petroleum reservoir // Int. J. Syst. Bacteriol. 1997. V. 47. P. 505–509.

- Härtig C. Rapid identification of fatty acid methyl esters using a multidimensional gas chromatography-mass spectrometry database // *J. Chromatogr.* 2008. V. 1177. P. 159–169.
- Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A., Minh B.Q., Vinh L.S. UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35. P. 518–522.
- Huber H., Stetter K.O. Order, I. *Deferribacterales* ord. nov. // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. V. 1. The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria / Eds. Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M. Springer: New York, 2001. V. 1. P. 465–471.
- 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.
- Iino T., Nakagawa T., Mori K., Harayama S., Suzuki K. *Calditerrivibrio nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, nitrate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Japan // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008. V. 58. P. 1675–1679.
- Jousset A., Bienhold C., Chatzinotas A., Gallien L., Gobet A., Kurm V., Küsel K., Rillig M.C. Rivett D.W. Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings // *ISME J.* 2017. V. 11. P. 853–862.
- Kalyanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., von Haeseler A., Jermiin L.S. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. P. 587–589.
- Krauze P., Kämpf H., Horn F., Liu Q., Voropaev A., Wagner D., Alawi M. Microbiological and geochemical survey of CO<sub>2</sub>-dominated mofette and mineral waters of the Cheb Basin, Czech Republic // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 2446.
- Kublanov I.V., Sigalova O.M., Gavrilov S.N., Lebedinsky A.V., Rinke C., Kovaleva O., Chernyh N.A., Ivanova N., Daum C., Reddy T.B.K., Klenk H.-P., Spring S., Göker M., Reva O.N., Miroshnichenko M.L., Kyrpidis N.C., Woyke T., Gelfand M.S., Bonch-Osmolovskaya E.A. Genomic analysis of *Caldithrix abyssi*, the thermophilic anaerobic bacterium of the novel bacterial phylum *Calditrichaeota* // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 195.
- Lavrushin V.Y., Lisenkov A.B., Aidarkozhina A.S. Genesis of the Yessentuki deposit of carbonated waters, North Caucasus // *Geochem. Int.* 2020. V. 58. P. 77–90.
- Leclerc H., da Costa M.S. Microbiology of natural mineral waters // *Technology of Bottled Water*, 2nd edn. / Eds. Senior D., Dege N. Blackwell Publishing Ltd., 2005. P. 325–387.
- Lesaulnier C.C., Herbold C.W., Pelikan C., Berry D., Gérard C., Le Coz X., Gagnot S., Niggemann J., Dittmar T., Singer G.A., Loy A. Bottled aqua incognita: microbiota assembly and dissolved organic matter diversity in natural mineral waters // *Microbiome.* 2017. V. 5. Art. 126.
- Lower B.H., Lins R.D., Oestreicher Z., Straatsma T.P., Hochella M.F., Shi L., Lower S.K. *In vitro* evolution of a peptide with a hematite binding motif that may constitute a natural metal-oxide binding archetype // *Environ. Sci. Technol.* 2008. V. 42. P. 3821–3827.
- Loy A., Beisker W., Meier H. Diversity of bacteria growing in natural mineral water after bottling // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. P. 3624–3632.
- Mardanov A.V., Slododkina G.B., Slobodkin A.I., Beletsky A.V., Gavrilov S.N., Kublanov I.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Skryabin K.G., Ravin N. The *Geoglobus acetivorans* genome: Fe(III) reduction, acetate utilization, autotrophic growth, and degradation of aromatic compounds in a hyperthermophilic archaeon // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. V. 81. P. 1003–1012.
- Mendoza-Hoffmann F., Pérez-Oseguera A., Cevallos M.A., Zarco-Zavala M., Ortega R., Peña-Segura C., Espinoza-Simón E., Uribe-Carvajal S. García-Trejo J.J. The biological role of the  $\zeta$  subunit as unidirectional inhibitor of the F1F0-ATPase of *Paracoccus denitrificans* // *Cell Reports.* 2018. V. 22. P. 1067–1078.
- 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.* 2021. V. 11. Art. 953.
- Myhr S., Torsvik T. *Denitrovibrio acetiphilus*, a novel genus and species of dissimilatory nitrate-reducing bacterium isolated from an oil reservoir model column // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000. V. 50. P. 1611–1619.
- Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 2015. V. 32. P. 268–274.
- Parks D.H., Chuvochina M., Chaumeil P.A., Rinke C., Musig A.J., Hugenholtz P.A. Complete domain-to-species taxonomy for Bacteria and Archaea // *Nat. Biotechnol.* 2020. V. 38. P. 1079–1086.
- Pitcher R.S., Brittain T., Watmough N.J. Cytochrome *cbb*<sub>3</sub> oxidase and bacterial microaerobic metabolism // *Biochem. Soc. Trans.* 2002. V. 30. P. 653–658.
- Rauschenbach I., Posternak V., Cantarella P., McConnell J., Starovoytov V., Häggblom M.M. *Selenivibrio woodruffii* gen. nov., sp. nov., a selenate- and arsenate-respiring bacterium in the *Deferribacteraceae* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013. V. 63. P. 3659–3665.
- Robertson B.R., O'Rourke J.L., Neilan B.A., Vandamme P., On S.L.W., Fox J.G., Lee A. *Mucispirillum schaedleri* gen. nov., sp. nov., a spiral-shaped bacterium colonizing the mucus layer of the gastrointestinal tract of laboratory rodents // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005. V. 55. P. 1199–1204.
- Rothery R.A., Gregory J., Workun G.J., Weiner J.H. The prokaryotic complex iron-sulfur molybdoenzyme family // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1778. P. 1897–1929.
- Sala-Comorera L., Caudet-Segarra L., Galofré B., Lucena F., Blanch A.R., García-Aljaro C. Unravelling the composition of tap and mineral water microbiota: divergences between next-generation sequencing techniques and culture based methods // *Int. J. Food Microbiol.* 2020. V. 334. Art. 108850.

- Scheiner D. Determination of ammonia and Kjeldahl nitrogen by indophenol method // *Water Res.* 1976. V. 10. P. 31–36.
- Schicklberger M., Sturm G., Gescher J. Genomic plasticity enables a secondary electron transport pathway in *Shewanella oneidensis* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. P. 1150–1159.
- Shi L., Dong H., Reguera G., Beyenal H., Lu A., Liu J., Yu H.-Q., Fredrickson J.K. Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals // *Nat. Rev. Microbiol.* 2016. V. 14. P. 651–652.
- Simon J., Klotz M.G. Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1827. P. 114–135.
- Slobodkin A., Slobodkina G., Allioux M., Alain K., Jebbar M., Shadrin V., Kublanov I., Toshchakov S., Bonch-Osmolovskaya E. Genomic insights into the carbon and energy metabolism of a thermophilic deep-sea bacterium *Deferribacter autotrophicus* revealed new metabolic traits in the phylum *Deferribacteres* // *Genes.* 2019. V. 10. Art. 849.
- Sohm J.A., Webb E.A., Capone D.G. Emerging patterns of marine nitrogen fixation // *Nat. Rev. Microbiol.* 2011. V. 9. P. 499–508.
- Starwalt-Lee R., El-Naggar M.Y., Bond D.R., Gralnick J.A. Electrolocation? The evidence for redox-mediated taxis in *Shewanella oneidensis* // *Mol. Microbiol.* 2021. V. 115. P. 1069–1079.
- Stookey L.L. Ferrozine – a new spectrophotometric reagent for iron // *Anal. Chem.* 1970. V. 42. P. 779–781.
- Tamazawa S., Mayumi D., Mochimaru H., Sakata S., Maeda H., Wakayama T., Ikarashi M., Kamagata Y., Tamaki H. *Petrothermobacter organivorans* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, strictly anaerobic bacterium of the phylum *Deferribacteres* isolated from a deep subsurface oil reservoir // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 3982–3986.
- Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P., Zaslavsky L., Lomsadze A., Pruitt K.D., Borodovsky M., Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. P. 6614–6624.
- Toshchakov S.V., Lebedinsky A.V., Sokolova T.G., Zavarzina D.G., Korzhenkov A.A., Teplyuk A.V., Chistyakova N.I., Rusakov V.S., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V., Gavrilov S.N. Genomic insights into energy metabolism of *Carboxydocella thermotrophica* coupling hydrogenogenic CO oxidation with the reduction of Fe(III) minerals // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. Art. 1759.
- Trüper H.G., Schlegel H.G. Sulphur metabolism in *Thiorhodaceae* I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii* // *Ant. van Leeuwenhoek.* 1964. V. 30. P. 225–238.
- Voet A.R., Noguchi H., Addy C., Zhang K.Y., Tame J.R. Biomineralization of a cadmium chloride nanocrystal by a designed symmetrical protein // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015. V. 54. P. 9857–9860.
- Whitman W.B., Oren A., Chuvochina M., da Costa M.S., Garrity G.M., Rainey F.A., Rossello-Mora R., Schink B., Sutcliffe I., Trujillo M.E., Ventura S. Proposal of the suffix -ota to denote phyla. Addendum to “Proposal to include the rank of phylum in the International Code of Nomenclature of Prokaryotes” // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. V. 68. P. 967–969.
- Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads // *PLoS Comput. Biol.* 2017. V. 13. e1005595.
- Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. Formation of methane by bacterial extracts // *J. Biol. Chem.* 1963. V. 238. P. 2882–2888.
- Zhang Y., Shuikui D., Qingzhu G., Ganjurjav H., Xuexia W., Wei G. “Rare biosphere” plays important roles in regulating soil available nitrogen and plant biomass in alpine grassland ecosystems under climate changes // *Agric. Ecosyst. Environ.* 2019. V. 279. P. 187–193.

***Deferrivibrio essentukiensis* sp. nov., gen. nov., a Representative of *Deferrivibrionaceae* fam. nov., Isolated from the Subsurface Aquifer of Caucasian Mineral Waters**

**D. G. Zavarzina<sup>1</sup>\*, M. I. Prokofieva<sup>1</sup>, V. A. Pikhtereva<sup>2</sup>, A. A. Klyukina<sup>1</sup>, A. A. Maslov<sup>3</sup>, A. Yu. Merkel<sup>1</sup>, and S. N. Gavrilov<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup>*Department of Biology, Moscow State University M.V. Lomonosov, Moscow, 119234 Russia*

<sup>3</sup>*Department of Geology, Moscow State University M.V. Lomonosov, Moscow, 119991 Russia*

\*e-mail: zavarzinatwo@mail.ru

Received November 25, 2021; revised December 01, 2021; accepted December 01, 2021

**Abstract**—The Yessentukskoye deposit of Caucasian mineral waters contains balneologically valuable drinking mineral water, which is extracted from the Upper Cretaceous subsurface aquifer (1 km deep) and is almost unexplored by microbiologists. We have sampled this water via continuously operating production wells, characterized the phylogenetic diversity of its microbial community, and obtained enrichments of thermophilic iron reducers from the source aquifer. From the enrichments, a novel anaerobic thermophilic bacteri-

um, reducing Fe(III) in the mineral ferrihydrite with acetate as the electron donor, was isolated into a pure culture. The novel isolate, designated as strain Es71-Z0220<sup>T</sup> belonged to the order *Deferribacterales*; it was a thermophilic, neutrophilic, halotolerant, motile vibrio. It utilized synthesized ferrihydrite, fumarate, nitrate or elemental sulfur as the electron acceptors with organic acids as the electron donors. The strain was incapable of reducing soluble Fe(III) complexes and of fermentative growth. The draft genome assembly of strain Es71-Z0220<sup>T</sup> resulted in 65 contigs with a total size of ca. 2.3 Mb. On the basis of whole-genome phylogenetic reconstruction and physiological characterization, it was concluded that the isolate represented a novel family, genus, and species, for which the name *Deferrivibrio essentukiensis* gen. nov., sp. nov. is proposed. Genome analysis revealed key determinants of anaerobic respiration and carbon substrate utilization pathways in the organism with peculiarities related to putative Fe(III)-reducing electron transfer chain. Considering the revealed metabolic features of *Deferrivibrio essentukiensis*, the involvement of the organism in its subsurface environment in biogeochemical carbon cycling in by coupling the organic matter oxidation with Fe(III) minerals reduction is discussed.

**Keywords:** *Deferribacterales*, subsurface biosphere, iron reduction, thermophiles, mineral water aquifers