

УДК 579.24+574.38+574.472+579.8.06+550.72

ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ Fe- И Mn-ОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ И ЧИСЛЕННОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В Fe-Mn ОРТШТЕЙНАХ РАЗНОГО РАЗМЕРА

© 2024 г. Я. О. Тимофеева^a, Е. С. Мартыненко^{a, b, *}, М. Л. Сидоренко^a,
А. В. Ким^{a, b}, В. М. Казарин^a

^aФедеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН,
Владивосток, 690022 Россия

^bДальневосточный федеральный университет, Владивосток, о. Русский, 690922 Россия

*e-mail: martynenko98@inbox.ru

Поступила в редакцию 09.10.2023 г.

После доработки 18.10.2023 г.

Принята к публикации 20.10.2023 г.

Проанализировано таксономическое разнообразие и численное распределение культивируемых форм Fe- и Mn-окисляющих микроорганизмов в Fe-Mn ортштейнах разного размера и почвенном мелкоземе дерново-буро-подзолистых глееватых почв, сформированных на территории, не подверженной влиянию прямого техногенного воздействия. Результаты получены с использованием комбинации микробиологических, молекулярных и аналитических методов, а также не инвазивных методик. Основным объемом микроорганизмов, культивированных из ортштейнов, относился к группе Mn-окисляющих. В ортштейнах идентифицированы бактерии родов *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, *Priestia*, из которых 4 рода являлись ортштейно-специфичными. Специфика численного распределения Mn- и Fe-окисляющих микроорганизмов во внешней и внутренней зонах ортштейнов разного размера отражает участие Mn-окисляющих микроорганизмов на всех стадиях формирования и развития ортштейнов и Fe-окисляющих микроорганизмов на начальных этапах их формирования. В исследованных ортштейнах обнаружены сферулы и губчатые структуры бактериальной природы. Почвенный мелкозем, вмещающий ортштейны, характеризуется изменением численности доминантных групп микроорганизмов по профилю. Марганец-окисляющие бактерии почвенного мелкозема представлены родами *Priestia* и *Methylobacterium*.

Ключевые слова: Fe-Mn ортштейны, Mn-окисляющие микроорганизмы, Fe-окисляющие микроорганизмы, таксономический состав бактерий, дерново-буро-подзолистые глееватые почвы

DOI: 10.31857/S0026365624030047

Железо-марганцевые ортштейны (ЖМО) представляют собой обособленные от вмещающей почвенной массы образования со специфичным строением и составом (минералогический, химический) и являются наиболее распространенной формой почвенных марганцево-железистых конкреционных новообразований (Росликова, 1996; Зайдельман, Никифорова, 2001; Timofeeva et al., 2014; Ettler et al., 2017; Gasparatos et al., 2019; Timofeeva et al., 2021). Результаты многочисленных исследований указывают на диагностическое значение ЖМО в почвах с переменным типом окислительно-восстановительного режима и на эффективность ЖМО в накоплении и ограничении подвижности ряда элементов с переменной валентностью (Cornu et al., 2005; Tan et al., 2006; Gasparatos, 2012; Пуртова, Тимофеева, 2022; Fischel et al., 2023). В настоящее время в разделе исследования почвенных ЖМО имеется достаточно большой объем

информации, посвященный вопросам их состава, строения, распределения и генезиса. Обязательными условиями для образования и развития ЖМО являются наличие в почвенном мелкоземе достаточного количества ионов Fe, Mn и контрастное чередование окислительно-восстановительных процессов (Костенков, 1986; Росликова, 1996; Зайдельман, Никифорова, 2001; Gasparatos et al., 2019; Sipos et al., 2022; Fischel et al., 2023). Несмотря на существование спорных точек зрения, механизм образования ЖМО в почвах определяется факторами, способствующими осаждению в микрочастицах основных ортштейнообразующих соединений ((гидр)оксиды Fe и Mn) (Костенков, 1986; Зайдельман, Никифорова, 2001; Тимофеева, Голов, 2010; Gasparatos et al., 2019). Одним из таких факторов является микробиологическая трансформация Fe и Mn, которая включает извлечение металлов из почвенного раствора, их дальнейшее осаждение

и накопление микроорганизмами (Аристовская, 1975; Пиневиц, 2005; Водяницкий, 2010; Лысак и соавт., 2013).

В отечественной и зарубежной литературе недостаточно результатов исследований, охватывающих вопросы участия почвенной микрофлоры в формировании и развитии ЖМО, чтобы однозначно оценить вклад микроорганизмов в процессы трансформации элементов при образовании ортштейнов в почвах и круговороте элементов в целом. Результаты немногочисленных исследований, направленных на изучение состава микроорганизмов в Fe-Mn новообразованиях, демонстрируют варьирование таксономических групп и бактериальных комплексов в новообразованиях различных типов почв (Шапова, 1994; Лысак и соавт., 2013; Hu et al., 2015). В конкрециях дерново-подзолистых почв Московской области обнаружены представители филумов *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*; из конкреций почв рисовых и тростниковых полей на юге Китая выделены представители *Burkholderiales*, *Rhodocyclales*, *Acidobacteriales*, *Desulfuromonales* и *Clostridiales*; в ЖМО почв морских террас США отмечено ведущее участие микроскопических грибов в осаждении Fe (Schulz et al., 2010; Лысак и соавт., 2013; Hu et al., 2015).

Почвы юга Дальнего Востока характеризуются активным проявлением процесса ортштейнообразования. Содержание ЖМО в отдельных горизонтах почв может достигать 33% от веса почвенной массы (Росликова, 1996; Тимофеева, 2008; Timofeeva et al., 2021; Пуртова, Тимофеева, 2022). При этом сведения о роли микроорганизмов в формировании ЖМО весьма эпизодичны и представлены единичными упоминаниями об участии видов *Pedomicrobium* и *Metallogenium* в начальных стадиях формирования ортштейнов (Шапова, 1994). Кроме того, основная часть результатов исследований микроорганизмов в ЖМО представлена данными, полученными с территорий, испытывающих воздействие различных техногенных факторов (почвы урбанизированных ландшафтов, агроэкосистем). Это не позволяет получить достоверную информацию об участии различных групп почвенных микроорганизмов в формировании и развитии ЖМО в почвах естественных, не нарушенных антропогенной деятельностью экосистем и оценить воздействие техногенеза на прохождение указанных процессов.

Целью исследования являлось изучение численности культивируемых форм микроорганизмов и таксономического разнообразия Fe- и Mn-окисляющих бактерий в ортштейнах разного размера, формирующихся в почвах, не испытывающих прямого техногенного воздействия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследований. Для оценки вклада микроорганизмов в формирование ЖМО заложено три полнопрофильных почвенных разреза на территории национального парка “Земля Леопарда” (43°50'69"–43°52'60" с.ш., 131°73'00"68–131°71'55" в.д.), который расположен на юго-западе Приморского края. Территория национального парка не подвержена влиянию прямого техногенного воздействия и относится к условно незагрязненной. Объектом исследований являлись образцы ЖМО и вмещающего почвенного мелкозема дерново-буро-подзолистый глееватых почв. Исследованные почвы имели следующее строение профиля: горизонт АУ (мощность от 11 до 16 см) — темно-серого цвета, однородной окраски, содержит плотные и мягкие бурые Fe-Mn ортштейны бурого и темно-бурого цветов, легкосуглинистый, комковатой структуры, рыхлый с волнистой границей и ясным переходом в горизонт Yelnn (мощность от 8 до 12 см) — серовато-бурого цвета с единичными мелкими размытыми пятнами темно-бурого цвета, встречаются многочисленные мелкие примазки охристого и темно-бурого цветов, содержит плотные и мягкие бурые Fe-Mn ортштейны, среднесуглинистый, комковато-призматической структуры, уплотнен, переход в нижележащий горизонт постепенный, граница не выражена, BELnn, g (мощность от 32 до 41 см) — бурого цвета с многочисленными контрастными пятнами охристого цвета, встречаются многочисленные примазки охристого цвета, содержит плотные и мягкие темно-бурые Fe-Mn ортштейны, тяжелосуглинистый, мелко-призматической структуры, плотный, переход в нижележащий горизонт постепенный, граница языковатая, VTg (мощность от 39 до 53 см) — темно-бурый с многочисленными мелкими размытыми пятнами охристого цвета, встречаются многочисленные примазки охристого цвета, содержит плотные и мягкие темно-бурые Fe-Mn ортштейны, глинистый, призматической структуры, твердый, переход нижележащий горизонт постепенный, граница волнистая, BCg (мощность до 23 см) — охристо-бурого цвета с многочисленными крупными размытыми пятнами охристого и сизого цветов, встречаются единичные мелкие примазки темно-бурого цвета, в верхней части горизонта присутствуют единичные мягкие и плотные Fe-Mn ортштейны разного размера, глинистый, крупно-призматической структуры, плотный. Названия почв приведены согласно классификации и диагностике почв России (Классификация и диагностика почв России, 2004).

Отбор образцов. Для микробиологических исследований почвенные монолиты, содержащие ЖМО, отбирали стерильными инструментами и помещали в стерильный упаковочный материал

согласно ГОСТ 17.4.4.02–84. Образцы были упакованы в сумки-холодильники и доставлены в лабораторию для незамедлительного исследования. В лабораторных условиях ЖМО тщательно отделяли от вмещающего почвенного мелкозема при помощи захватного прецизионного пинцета и настольной оптической лупы с 10-кратным увеличением. Разделение ЖМО по размерным фракциям проводили при помощи линейки. Марганец- (MnOM) и Fe-окисляющие микроорганизмы (FeOM) культивировали из внешней и внутренней зон ЖМО и вмещающего почвенного мелкозема. Для выделения микроорганизмов из внутренней зоны ЖМО промывали физиологическим раствором и стерилизовали 70% раствором C_2H_5OH в течение 1 мин, далее трижды промывали стерильным физиологическим раствором с последующим измельчением (Zhang et al., 2008; Hu et al., 2015). Для определения химического состава ЖМО отбирали по почвенным генетическим горизонтам методом мокрого просеивания, с дальнейшим отделением ЖМО от примесей (осколки минералов, органические остатки) в лабораторных условиях (Timofeeva et al., 2021; Пуртова, Тимофеева, 2021). Очистка поверхности ЖМО от частиц почвенного мелкозема проводилась при помощи 20 мин. погружения в ультразвуковую ванну в спиртовой раствор (50%) согласно рекомендациям Etlger et al. (2017). При исследовании распределения элементов внутри ЖМО отдельные образцы ЖМО фиксировали в эпоксидной смоле.

Культивирование. Навески образцов ЖМО и вмещающего ЖМО почвенного мелкозема (10 г) помещали в колбы со 100 мл физиологического раствора, согласно рекомендациям Д. Г. Звягинцева (Звягинцев, 1991). Полученный раствор суспендировали на орбитальном шейкере Shaker S-3. 09M (“ELMI”, Латвия) в течение 30 мин при 110 об./мин (Логинова и соавт., 2011); 0.1 мл полученных суспензий вносили на поверхность плотных питательных сред в чашки Петри (Звягинцев, 1991). Продолжительность культивирования составляла 14 сут при температуре 20–22°C (Федорюк, Няникова, 2015). В работе использовали специальную плотную питательную среду следующего состава (г/л): $(NH_4)_2SO_4$ – 0.5, $NaNO_3$ – 0.5, K_2HPO_4 – 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.5, лимонная кислота – 10, сахароза – 2, триптон – 1, агар-агар – 20; pH 6.8; в которую вносили $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ в количестве 5.9 г/л и $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ – 4.7 г/л для культивирования FeOM и MnOM соответственно (Захарова, Парфенова, 2007).

Геномная ДНК чистых культур бактерий, выращенных на специальной питательной агаризованной среде для культивирования Fe- и Mn-окисляющих бактерий, была выделена с помощью набора реагентов НК-сорбент “Base” (“Литех”) в соответствии с инструкцией производителя.

Для амплификации фрагмента гена 16S рРНК использовали набор реагентов Био-Мастер HS-Тaq ПЦР (2×) (“Biolabmix”, Россия) согласно протоколу с добавлением универсальных бактериальных праймеров 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' и 1350R5'-GACGGGCGGTGTGTACAAG-3' (Lane et al., 1985). Амплификацию проводили на My Cycler (“BioRad”, США) при режиме: 94°C – 4 мин (1 цикл); 94°C – 60 с, 48°C – 60 с, 72°C – 90 с (5 циклов); 92°C – 60 с, 50°C – 110 с, 72°C – 90 с (10 циклов); 92°C – 60 с, 52°C – 60 с, 72°C – 60 с (10 циклов); 92°C – 60 с, 54°C – 60 с, 72°C – 110 с (10 циклов); 72°C – 10 мин (1 цикл) (Lane et al., 1985).

ПЦР-продукты разделяли в агарозном геле (1%) с добавлением этидиум бромид в электрофорезной камере при напряженности поля около 2 В/см, результаты учитывали на трансиллюминаторе Квант 312 (“Хеликон”, Россия) под ультрафиолетовым излучением.

Очистка полученных ампликонов была проведена с помощью набора для ферментативной очистки продуктов ПЦР ExoSAP-IT Express (“Thermo FS”, США) согласно протоколу. Очищенные ПЦР-продукты секвенировали по методу Сенгера, используя набор реагентов Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) для подготовки нуклеотидных последовательностей к прочтению на генетическом анализаторе Нанофор-05 (“Синтол”, Россия).

Филогенетический анализ проводили путем поиска гомологичных последовательностей в международном банке данных (GenBank) с помощью программы BLAST (Altschul et al., 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Редактирование последовательностей выполнено в редакторе MEGA 11, для выравнивания последовательностей использовали алгоритм программы CLUSTAL W (<http://www.genebee.msu.su/clustal>). Филогенетическое дерево построено с использованием метода ближайших соседей (neighbor-joining) на основе алгоритма Kimura two-parameters в программе MEGA 11 (Kumar et al., 2016). Показатель достоверности порядка ветвления определяли на основании bootstrap-анализа 100 альтернативных деревьев.

Нуклеотидные последовательности фрагментов гена 16S рРНК отдельных штаммов бактерий внесены в базу данных GenBank под номерами OR039558–OR039569.

Содержание оксидов Fe и Mn в образцах ЖМО и вмещающих почв определяли методом энергодисперсионной рентгенфлуоресцентной спектроскопии на анализаторе EDX 800HS-P (“Shimadzu”, Япония) с использованием 8-ми государственных стандартных образцов сравнения согласно М-02-0604-2007 (Методика выполнения измерений..., 2007). Описание параметров измерения, формата и рабочей среды при проведении анализа

приведены в работе Пуртовой, Тимофеевой (Пуртова, Тимофеева, 2021). Проверка достоверности измерений осуществлялась путем анализа 1 стандартного образца через 10 неизвестных (опытных) образцов. Максимальный уровень отклонения содержания оксидов макроэлементов от сертифицированных значений стандартного образца в опытных образцах составлял не более 0.9%.

Электронная микроскопия. Изображения структур бактериальной и минеральной природы и карты распределения элементов внутри ЖМО получали с помощью электронного сканирующего микроскопа MERLIN (“Carl Zeiss”, Германия), оснащенного энергодисперсионным спектрометром INCA Energy 350 X–Max 150 (“Oxford Instruments”, Abingdon, Великобритания).

В работе использовали современное научное оборудование Центра коллективного пользования “Биотехнология и генетическая инженерия” на базе ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

Таксономическая характеристика штаммов выделенных бактерий проведена на основе анализа структуры гена 16S рНК по методу Сэнгера на базе лаборатории морской микробиологии Института Мирового океана ДВФУ.

Математическая обработка полученных данных включала расчет медианных значений, среднеквадратического отклонения, коэффициента накопления элементов в ортштейнах (Gasparatos, 2012), корреляционный анализ и проводилась с применением программ Statistica и Microsoft Excel 2007. Уровень значимости полученных результатов (P) не превышал 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Профильное распределение Fe- и Mn-окисляющих микроорганизмов в почвенном мелкозем. Исследованные почвы имеют ярко выраженную дифференциацию по численности и составу изученных микроорганизмов (рис. 1).

Полученные результаты указывают на численное преобладание MnOM над FeOM в двух верхних горизонтах почв. В нижележащих горизонтах культивируемых MnOM обнаружить не удалось, что, вероятно, связано с изменением условий аэрации почв в средней и нижней частях профиля. Также с глубиной залегания почвенного горизонта снижается видовое разнообразие микроорганизмов (Fieger et al., 2003). FeOM были культивированы из верхнего (AY) и срединного (BELnn) горизонтов исследованных почв. Максимальное содержание FeOM обнаружено в срединном горизонте, что указывает на большую устойчивость данных микроорганизмов к изменению водно-воздушного режима.

Несмотря на принадлежность части изученных микроорганизмов к группе MnOM,

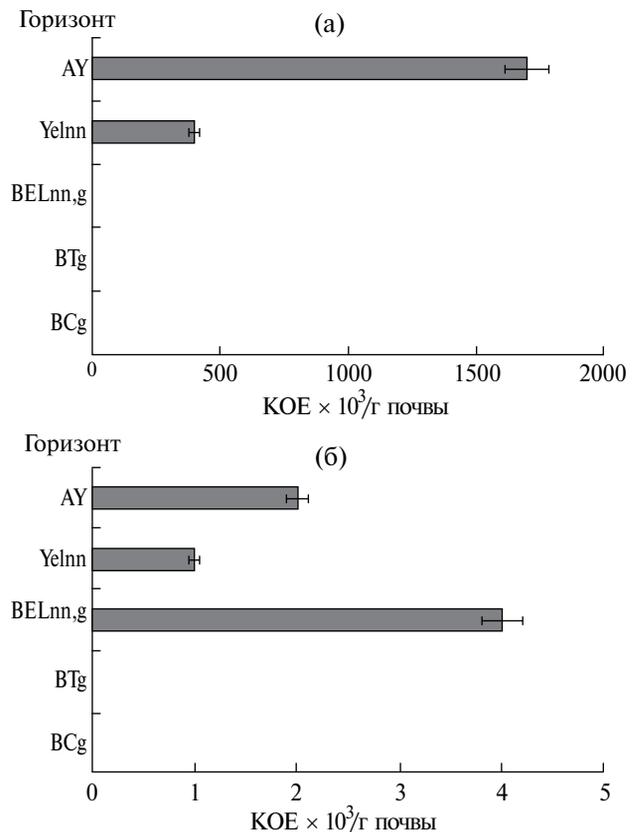


Рис. 1. Численность Mn-окисляющих (а) и Fe-окисляющих (б) микроорганизмов в почвенном мелкозем.

предполагающую непосредственное участие ионов Mn в процессах метаболизма, взаимосвязь между содержанием Mn в почвенном мелкозем и численностью MnOM была обратно пропорциональной ($r = -0.99$) (табл. 1).

Вероятно, это связано с нахождением большего объема Mn в почвенном мелкозем в составе комплексных соединений, в которых преобладают восстановленные (преимущественно четырехвалентные) формы Mn (Мартынова, 2012). В исследованных почвах наибольшее влияние на размножение MnOM и развитие их биомассы оказывало содержание в почвах оксидов Fe ($r = 0.99$). Это обусловлено содержанием ионов Fe во многих ферментах, участвующих в фундаментальных физиологических процессах (дыхание, центральный метаболизм, восстановление ДНК) (Andreini et al., 2008; Frawley, Fang, 2014). Из почвенного мелкозема изолированы Mn-окисляющие бактерии, относящиеся к родам *Priestia* и *Methylobacterium* (рис. 2).

Данные бактерии выделяются из почв повсеместно (Лысак, 2007). Результаты ряда работ указывают на непосредственное участие бактерий рода *Priestia* и *Methylobacterium* в процессах трансформации Fe и Mn в почвах (Аристовская, 1975; Пиневиц, 2005; Hu et al., 2015; Gupta et al., 2020; Lyu et al., 2021).

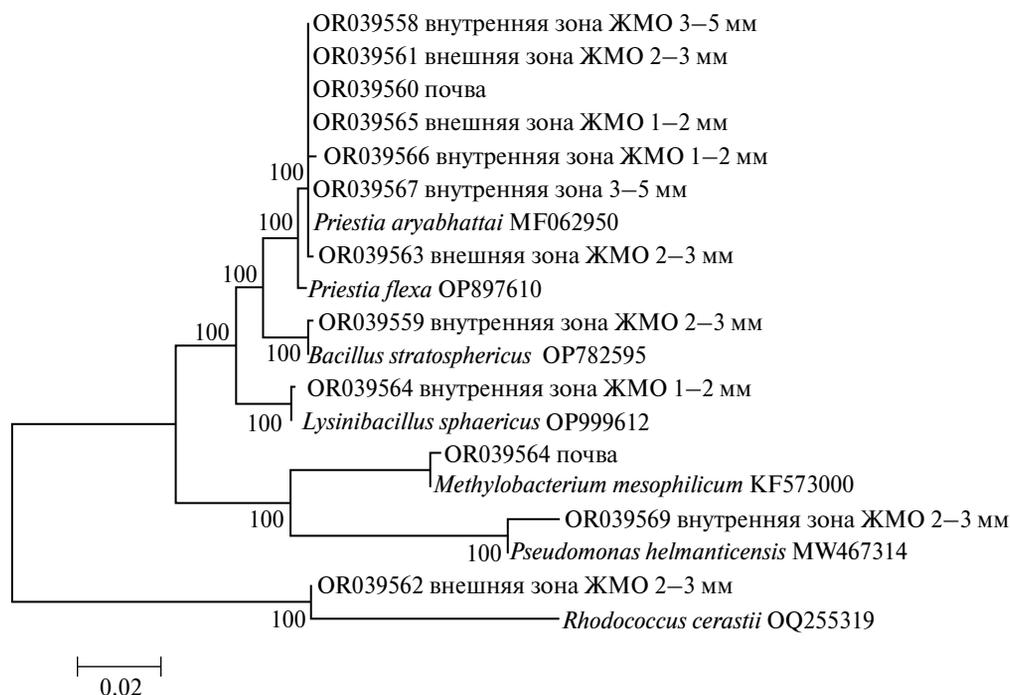


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа последовательностей фрагментов гена 16S рРНК бактерий, изолированных из почвенного мелкозема и ортштейнов. Дендрограмма построена на основе алгоритма метода объединения ближайших соседей (NJ). Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. Представлены значения бутструп поддержки выше 50%.

Таблица 1. Содержание и накопление Fe и Mn в почвах и ортштейнах, медианное значение \pm значение средноквадратического отклонения

Горизонт	Объект	MnO		Fe ₂ O ₃	
		Содержание оксидов, мг/кг	Коэффициент накопления	Содержание оксидов, мг/кг	Коэффициент накопления
AY	Почва	0.08 \pm 0.004		3.82 \pm 0.150	
	Ортштейн	0.78 \pm 0.030	9.75	24.07 \pm 0.880	6.30
Yelnn	Почва	0.11 \pm 0.005		3.63 \pm 0.140	
	Ортштейн	0.69 \pm 0.026	6.27	23.46 \pm 0.870	6.46
BELnn, g	Почва	0.05 \pm 0.002		3.50 \pm 0.160	
	Ортштейн	0.90 \pm 0.040	18.00	22.71 \pm 0.900	6.48
BTg	Почва	0.06 \pm 0.001		7.81 \pm 0.340	
	Ортштейн	1.42 \pm 0.049	23.67	18.23 \pm 0.740	2.33
BCg	Почва	0.08 \pm 0.003		6.51 \pm 0.270	
	Ортштейн	4.59 \pm 0.155	57.37	10.80 \pm 0.360	1.66

Fe- и Mn-окисляющие микроорганизмы в ортштейнах. Подавляющий объем численности микроорганизмов в ЖМО представлен MnOM (табл. 2).

В отличие от почвенного мелкозема, MnOM идентифицированы в ЖМО, сформированных не только в верхней, но и в нижней части профиля (до глубины 140 см). Отсутствие культивируемых форм MnOM во вмещающем почвенном мелкоземе и их наличие в ЖМО в одних и тех же горизонтах

позволяет предположить проявление кратковременных окислительно-восстановительных периодов, в которые MnOM попадают в нижележащие горизонты (преимущественно с гравитационным током почвенного раствора) и образуют микрозоны. Такие микрозоны могут являться первичным ядром для образования ЖМО. В отдельных исследованиях подобные образования идентифицируют как “прото-конкреции” (Dabard, Loi, 2012).

Таблица 2. Содержание Mn- и Fe-окисляющих микроорганизмов в ортштейнах разного размера (КОЕ × 10³/г ортштейнов), медианное значение ± значение среднеквадратического отклонения

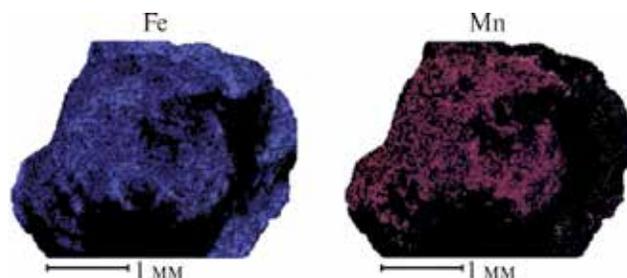
Горизонт	Размерная фракция ортштейнов	MnOM		FeOM	
		Внешняя зона	Внутренняя зона	Внешняя зона	Внутренняя зона
AY	1–2 мм	20.0 ± 1.0	38.4 ± 1.9	4.0 ± 0.2	–
	2–3 мм	40.0 ± 2.0	11.2 ± 0.5	–	–
	3–5 мм	170.0 ± 8.5	24.0 ± 1.2	–	–
Yelnn	1–2 мм	3.0 ± 0.1	22.4 ± 1.12	5.0 ± 0.2	–
	2–3 мм	20.0 ± 1.0	9.6 ± 0.4	–	–
	3–5 мм	10.0 ± 0.5	2.1 ± 0.1	–	–
BELnn, g	1–2 мм	110.0 ± 5.5	–	–	–
	2–3 мм	1330.0 ± 66.5	9.0 ± 0.4	–	–
	3–5 мм	4.0 ± 0.2	4.0 ± 0.2	–	–
BTg	1–2 мм	–	11.3 ± 0.6	–	–
	2–3 мм	–	–	–	–
	3–5 мм	–	–	–	–
BCg	1–2 мм	–	–	–	–
	2–3 мм	650.0 ± 32.5	1.3 ± 0.1	–	–
	3–5 мм	20.0 ± 1.0	26.4 ± 1.3	–	–

Широко исследованная способность отдельных групп почвенных микроорганизмов к окислению Mn(II) и осаждению (гидр)оксидов Mn на поверхности клеток способствует образованию микросферических агрегатов, что в последующем, возможно, приводит к формированию ЖМО. Данное предположение может подтверждаться спецификой распределения Fe и Mn внутри ЖМО. В изученных образцах ЖМО всех размеров четко идентифицировано ядро (внутренняя зона ортштейнов), обогащенное ионами Mn (рис. 3).

Также наличие MnOM в ЖМО при их отсутствии в почвенном мелкоземе подтверждает обособленность ЖМО как закрытой системы, характеризующейся отличными от вмещающих горизонтов показателями pH (более кислая реакция среды), Eh (ниже величины вмещающей почвенной массы), C_{общ} (накопление в ЖМО) (Костенков, 1986; Пуртова, Тимофеева, 2021). Вероятно, при сезонной смене окислительно-восстановительного режима микроорганизмы, находящиеся в почвенном мелкоземе средней и нижней частях профиля, отмирают или могут быть представлены некультивируемыми формами. При этом в ЖМО сохраняется среда, обеспечивающая жизнеспособное состояние MnOM, что дополнительно

подтверждается наличием культивируемых форм MnOM не только во внешней, но и во внутренней зонах ортштейнов (табл. 2).

Непосредственное участие FeOM в процессе образования ЖМО освещено в ряде работ (Аристовская, 1975; Пиневиц, 2005; Водяницкий, 2010). При проведении настоящих исследований FeOM удалось культивировать только из внешней зоны ЖМО размером 1–2 мм, сформированных в двух верхних горизонтах исследованных почв (AY, Yelnn). Полученные данные указывают на наличие жизнеспособных форм микроорганизмов данной группы только в зоне контакта ЖМО с вмещающим мелкоземом почв. Учитывая размер ЖМО, можно предположить, что FeOM в исследованных почвах принимают участие лишь на начальных стадиях формирования ЖМО, когда в новообразованиях еще присутствуют доступные для их роста и развития соединения Fe. Такими соединениями, как правило, являются аморфные и слабоокристаллизованные Fe-обогащенные компоненты ортштейнов. Данное предположение подтверждается результатами ряда работ (Liu et al., 2021; Sipos et al., 2022) о преобладании аморфных и слабоокристаллизованных соединений Fe в ЖМО мелких размерных фракций. В ЖМО крупного размера идентифицированы, преимущественно, окристаллизованные минералы Fe, которые содержат ионы Fe в недоступной для FeOM форме (Пиневиц, 2005; Timofeeva et al., 2014; Sipos et al., 2022). Однако результаты проведенных ранее исследований ЖМО разного размера в почвах исследуемого региона указывают на наличие окристаллизованных форм Fe и в ЖМО размером 1–2 мм (Timofeeva et al., 2014). Вероятно, одним из условий возможности культивирования FeOM из ЖМО размерной фракции 1–2 мм является их локализация в верхней части профиля. Результаты специализированных

**Рис. 3.** Карты распределения элементов в ортштейнах.

исследований демонстрируют замедление скорости кристаллизации соединений Fe в ЖМО и вмещающей почвенной массе в горизонтах, обогащенных органическим веществом (Fischel et al., 2023).

Из исследованных ЖМО различных размеров фракций идентифицированы бактерии, относящиеся к родам *Bacillus*, *Priestia*, *Rhodococcus*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*. Для большинства идентифицированных родов бактерий характерно участие в процессах трансформации соединений Fe и Mn в разных средах, в том числе в почвах. (Аристовская, 1975; Пиневиц, 2005; Cappelletti et al., 2020). Следует отметить, что результаты исследований, отражающих участие бактерий рода *Lysinibacillus* в процессах окисления и/или осаждения Fe и Mn в почвах, в данный момент недостаточно, чтобы однозначно утверждать о значимом влиянии таких бактерий на указанные процессы. Бактерии родов *Bacillus* и *Pseudomonas* ранее были выделены из конкреций почв различных регионов мира (Li-Mei et al., 2008; Hu et al., 2015; Lysak et al., 2019; Lyu et al., 2021). Бактерии, относящиеся к родам *Rhodococcus* и *Lysinibacillus*, насколько нам известно, ранее не были идентифицированы в почвенных ЖМО.

Таксономическое положение Fe- и Mn-окисляющих бактерий, изолированных из почвенного мелкозема и ортштейнов. При изучении таксономического положения выделенных из почв и ЖМО бактерий выявлено, что все штаммы относятся к трем филумам: *Pseudomonadota*, *Actinomycetota* и *Bacillota* (рис. 2). Штаммы OR039558, OR039558, OR039561, OR039565, OR039566, OR039567 имели высокую степень родства (99.51, 98.23, 100, 99.77, 99.47 и 99.47% соответственно) с гомологом MF062950 *Priestia aryabhatai*, полученным с корней томатов (Китай). Штамм OR039563 был гомологичен бактерии вида *Priestia flexa* (99.62%). Представители рода *Priestia* способны осаждать и накапливать металлы на поверхности и внутри клеток (Ghosh et al., 2018; Shahid et al., 2022). В ЖМО исследуемых почв роль полученных изолятов может быть схожей. У штамма OR039559 отмечена высокая степень гомологии со штаммом *Bacillus stratosphericus* (OP782595). Бактерии этого рода способны аккумулировать металлы, в том числе Mn^{2+} , из различного субстрата без изменений скорости роста (Li et al., 2023). Штамм OR039562 имел высокий процент сходства (99.88%) с *Rhodococcus cerastii* (OQ255319). Известно, что в составе рода *Rhodococcus* есть виды, способные окислять Mn, продуцируя Mn-зависимые пероксидазы DyP-типа (Singh et al., 2013; Jofre et al., 2021). Также у некоторых *Rhodococcus* spp. активность гидроксиллазы зависит от Mn, и бактерии специально используют гетерометаллический кофактор Mn/Fe для осуществления каталитической функционализации неактивированной первичной связи углерода (Powell et al., 2023). Вероятно, выделенный нами

штамм также может трансформировать Mn, окисляя и осаждая его.

Нуклеотидная последовательность штамма OR039564 имела 100% гомологию со штаммом из базы данных NCBI *Lysinibacillus sphaericus* (OP999612). Этот вид достаточно широко распространен в объектах окружающей среды и был выделен из различных сред и обогащенных металлами почв. В литературе отмечена способность *Lysinibacillus* spp. ограничивать подвижность тяжелых металлов в почвах за счет наличия на поверхности клетки белкового S-слоя (Suhr et al., 2016). Активная трансформация тяжелых металлов и снижение их токсичного воздействия на живые организмы установлены при совместном нахождении в почвенной среде *Lysinibacillus sphaericus*, *Bacillus* sp. и *Rhodococcus* sp. (Emenike et al., 2016). Штамм OR039568 гомологичен (99.85%) виду *Methylobacterium mesophilicum* (KF573000). Результаты ряда исследований указывают на способность *Methylobacterium* spp. восстанавливать Fe(III) и окислять Fe(II) (Hu et al., 2013; Aniwae et al., 2022). В работе Доурато и соавт. (Dourado et al., 2015) описаны гены у некоторых *Methylobacterium* spp., которые обеспечивают толерантность к накоплению металлов. Штамм OR039569 имеет 99.74% сходство с гомологом *Pseudomonas helmanticensis* (OP800175). Способность представителей рода *Pseudomonas* к окислению Mn и Fe широко освещена в литературе (Керкау et al., 2016; Li et al., 2023). В результате реакции окисления электроны проходят через терминальные оксидазы цитохрома *c* для восстановления кислорода и получения энергии для роста бактерий (Ciancio et al., 2022). Также у некоторых видов данного рода описаны два вида оксидазы Cu, которые участвуют в окислении Mn(II) и Mn(III) (Lyu et al., 2021).

Структуры бактериальной природы в ортштейнах. Во внешней и внутренней зонах исследованных ЖМО были обнаружены структуры правильной шарообразной формы, предположительно, бактериальной природы (рис. 4а, 4б).

Структуры встречались как в виде единичных сферул, так и в виде локализаций небольших групп. Размер данных структур (от 1.5 до 2.5 мкм) и преобладание углерода в элементном составе дополнительно указывают на возможность их отнесения к микроскопическим организмам. В ЖМО встречались шарообразные структуры, состоящие преимущественно из углерода, и структуры, покрытые соединениями Fe и Mn. Наибольшая плотность покрытия структур Fe и Mn отмечается в зоне контакта с веществом ЖМО, что указывает на осаждение основных ортштейнообразующих элементов на поверхности таких структур (рис. 4в). На основании результатов секвенирования и морфологического строения идентифицированных бактерий, вероятнее всего, обнаруженные сферулы являются

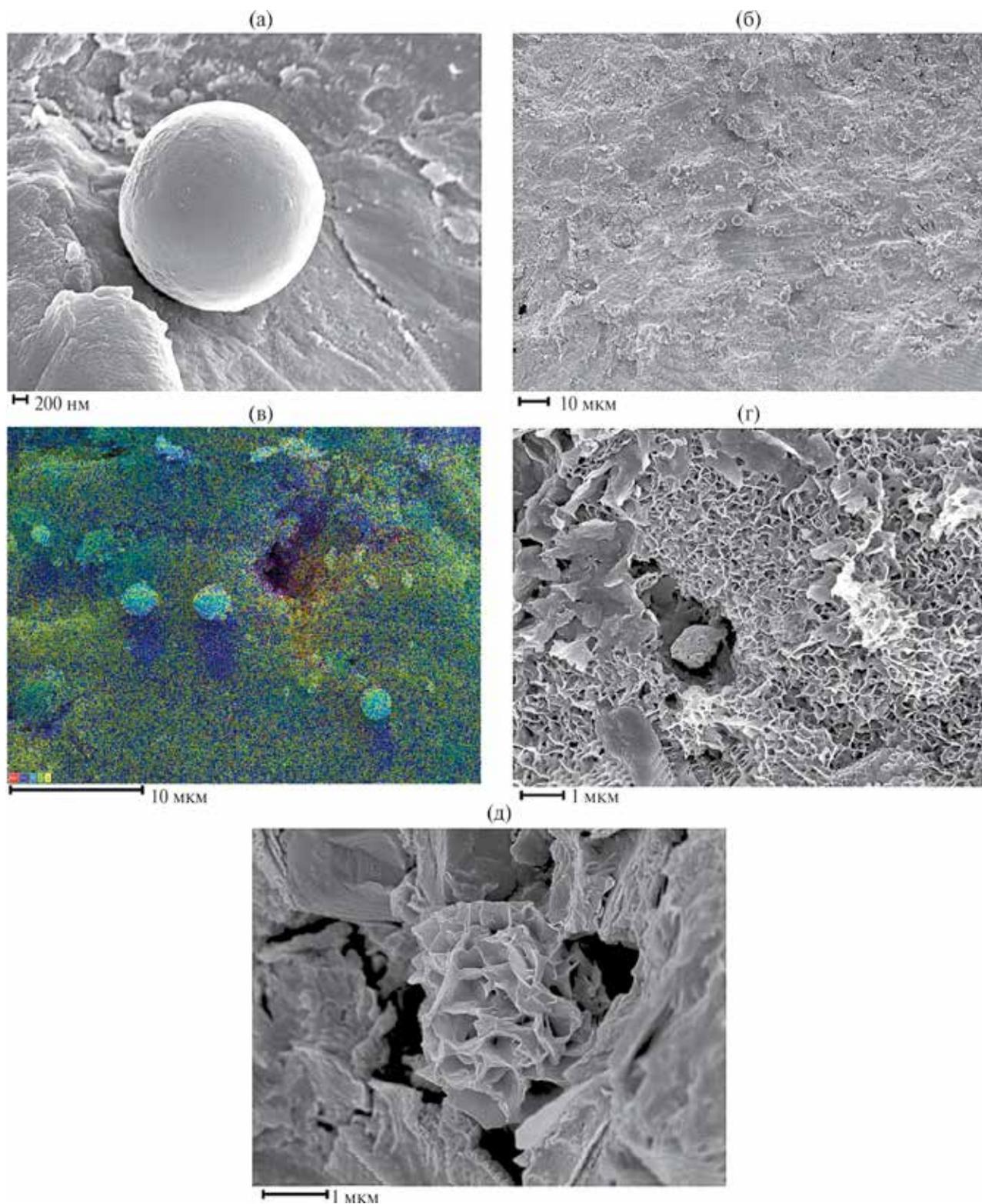


Рис. 4. Структуры в ортштейнах: а — сферула во внутренней зоне ортштейнов; б — группа сферул на поверхности ортштейна; в — элементный состав сферул; г — гликокаликс; д — “nanoflowers” (наноцветы).

представителями бактерий рода *Rhodococcus*. Также в ЖМО обнаружены скопления губчатых структур, схожие по морфологии с гликокаликсом бактерий и состоящие преимущественно из Fe, Mn и C (рис. 4г). Структуры с подобным строением были отмечены в Fe-Mn конкрециях океанов (Астафьева и соавт., 2021).

Участие Fe- и Mn-окисляющих микроорганизмов в формировании и развитии ортштейнов. Исходя из представленных в научной литературе теорий образований ЖМО, их формирование и развитие в почвах сопровождается увеличением размера (Gasparatos et al., 2019). Изучение количественного распределения MnOM и FeOM в ЖМО разного размера позволяет отразить специфику участия целевых групп микроорганизмов на различных стадиях формирования ЖМО в разных горизонтах почвенного профиля (табл. 2). Отличительной особенностью ЖМО размерной фракции 1–2 мм является наличие культивируемых форм FeOM, что, как было отмечено ранее, указывает на нахождение Fe-содержащих соединений в ЖМО данной размерной фракции в подходящей для функционирования FeOM форме. Исследование количества и распределения MnOM внутри ЖМО размера 1–2 мм, сформированных в различных горизонтах профиля, указывает на преимущественную локализацию MnOM во внутренней зоне ЖМО, сформированных в двух верхних горизонтах профиля (AY, Yeln) и в текстурном горизонте VTg. ЖМО данной размерной фракции, сформированные в горизонте BELnn, g, характеризуются присутствием MnOM только во внешней зоне. Из ЖМО этого горизонта выделено максимальное количество MnOM, характерное для размерной фракции 1–2 мм. Исходя из морфологических особенностей данного горизонта, можно предположить, что в горизонте BELnn, g происходит более быстрая и, соответственно, более контрастная смена окислительно-восстановительного режима, и процессы дегидратации и кристаллизации Mn-содержащих соединений внутри ЖМО идут более активно. Вероятно, локализация MnOM во внешней зоне ЖМО связана с присутствием доступных для микроорганизмов форм Mn только в объеме свежесаженных на поверхности ЖМО соединений. Данное предположение отчасти подтверждается особенностями распределения MnOM в ЖМО более крупных размерных фракций.

В ЖМО размеров 2–3 и 3–5 мм MnOM были выделены и из внешней, и из внутренней зон. Характерной особенностью ЖМО размера 2–3 мм является резкое увеличение количества MnOM во внешней зоне (от 2.1 до 500 раз). Также ЖМО данной размерной фракции отличаются наибольшим содержанием культивируемых MnOM среди всех изученных размерных фракций. Прежде всего, это связано с фактом активизации накопления Mn по мере роста ЖМО, что было подтверждено

проведенными ранее исследованиями (Тимофеева, 2008). Полученные результаты указывают на непосредственное участие MnOM в процессах трансформации Mn-содержащих соединений в ЖМО размера 2–3 мм, где основной объем Mn, осажденный на поверхности ортштейнов, представлен не окристаллизованными, соответственно, доступными для MnOM соединениями. В целом, в ЖМО размера 2–3 мм максимальное количество MnOM установлено в новообразованиях, сформированных в средней и нижней частях почвенного профиля (горизонты BELnn, g, BCg).

Внешняя зона ЖМО размерной фракции 3–5 мм, сформированных в верхней части почвенного профиля, также характеризуется повышенным содержанием культивируемых MnOM по сравнению с внутренней зоной. С продвижением вглубь почвенного профиля содержание MnOM во внешней и внутренней зонах ЖМО выравнивается. Наибольшее количество MnOM было выделено из ЖМО верхнего горизонта AY. В нижележащих горизонтах отмечено резкое снижение количества MnOM. В ЖМО горизонта BCg наблюдалось незначительное увеличение количества MnOM. В ЖМО данной размерной фракции процессы перевода Mn-содержащих соединений в окристаллизованные формы идут более интенсивно за счет активизации дегидратации аморфных соединений, обогащенных Mn, вероятно, с участием MnOM (Timofeeva et al., 2014). Подтверждением усиления минерализации и окристаллизации Mn-обогащенных соединений в ЖМО данного размера является наличие пластинчатых кристаллов, которые не были обнаружены в ортштейнах более мелкого размера (рис. 4д). Подобные розетки кристаллов внутри ортштейнов в литературе именуется как “nanoflowers” (наноцветы) и представляют собой минералы группы Mn (литиюфорит или бернесит) (Fischel et al., 2023). Доступные для MnOM соединения Mn в ЖМО размерной фракции 3–5 мм представлены в основном (гидр)оксидными соединениями, покрывающими кристаллы минералов (Timofeeva et al., 2014; Fischel et al., 2023).

Следует отметить отсутствие культивируемых форм исследуемых микроорганизмов в ЖМО размерных фракций 2–3 и 3–5 мм, формирующихся в текстурном горизонте VTg. Вероятно, это связано как с различным проявлением интенсивности микробиологических процессов в отдельных горизонтах почвенного профиля, так и с отмеченной в литературных источниках способностью ЖМО текстурных горизонтов активизировать накопление ряда тяжелых металлов до концентраций, ингибирующих рост и развитие микроорганизмов (Тимофеева, 2008; Холопов, 2013).

Анализ взаимосвязи между численностью культивируемых форм MnOM и содержанием MnO и Fe₂O₃ в ЖМО не подтвердил наличия

выраженной зависимости между этими переменными ($r_{\text{MnOM-Mn}}$ от -0.56 до 0.20 , $r_{\text{MnOM-Fe}}$ от -0.15 до 0.26). По аналогии с почвенным мелкоземом, отсутствие взаимосвязи может быть вызвано преимущественным нахождением ионов Mn и Fe в составе труднодоступных для МОМ соединений. Исключением из общей закономерности является средний уровень корреляционной зависимости ($r = 0.64$) между численностью MnOM и содержанием валовых форм Fe в ЖМО размерной фракции 1–2 мм, что является дополнительным подтверждением преобладания аморфных и слабокристаллизованных соединений Fe в ортштейнах на начальных стадиях их формирования.

Несмотря на отсутствие взаимосвязи между численностью MnOM и валовым содержанием Mn, на основе расчета корреляционной зависимости между изменением численности MnOM и интенсивностью накопления Mn ортштейнами, отмечено ярко выраженное влияние MnOM на накопление Mn в ЖМО размерных фракций 1–2 ($r = 0.99$) и 2–3 мм ($r = 0.96$), сформированных в верхней и средней частях профиля исследованных почв. В ЖМО более крупного размера коэффициент корреляции между численностью MnOM и уровнем накопления Mn был отрицательным ($r = -0.25$), что указывает на отсутствие влияния MnOM на процессы, формирующие накопительную способность ЖМО данного размера.

Таким образом, в работе отражено участие культивируемых форм MnOM и FeOM на разных стадиях формирования и развития ЖМО, формирующихся в профиле дерново-буро-подзолистых глееватых почв. Выявлены рода бактерии, определяющие образование ЖМО, и процессы, происходящие в ЖМО почв, не испытывающих влияния прямого техногенного воздействия.

Вмещающий ортштейны почвенный мелкозем характеризуется изменением целевых групп микроорганизмов по профилю. По численности изученных групп микроорганизмов в верхней части профиля отмечается преобладание MnOM над FeOM, с продвижением вглубь почвенного профиля происходит обратная смена доминантных групп. Параметром, оказывающим наибольшее влияние на численность MnOM, является содержание в почвах оксидов Fe. В почвенном мелкоземе бактерии, относящиеся к группе MnOM, представлены родами *Priestia* и *Methylobacterium*.

Основной объем микроорганизмов, культивируемых из почвенных ЖМО (внешняя и внутренняя зоны), представлен группой MnOM. В совокупности с особенностями распределения Mn в ЖМО полученные результаты позволяют предположить, что первичным звеном образования ЖМО в исследованных почвах могут являться скопления MnOM. Культивируемые FeOM были выделены только из внешней зоны мелких ЖМО, сформированных

в верхней части почвенного профиля, подтверждая участие FeOM лишь на начальных этапах формирования ЖМО.

В ЖМО идентифицированы бактерии, относящиеся к родам *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, *Priestia*. Таксономический состав бактерий, за исключением рода *Priestia*, был ортштейно-специфичным. Структуры бактериальной природы в ЖМО представлены единичными сферами и их небольшими группами. На поверхности сферул отмечено осаждение Fe и Mn. Также в ЖМО обнаружены губчатые структуры, схожие по морфологии с гликокаликсом бактерий.

Изучение количественного распределения MnOM и FeOM во внешней и внутренней зонах ЖМО разного размера указывает на участие MnOM на всех этапах их формирования и развития. Особенности количественного распределения MnOM в разных зонах ЖМО обоснованы наличием доступных для микроорганизмов форм Mn (свежеосажденные аморфные соединения). Наибольшее содержание культивируемых MnOM обнаружено в ЖМО размерной фракции 2–3 мм. Анализ взаимосвязи между численностью MnOM и интенсивностью накопления Mn позволил отразить активное участие данной группы микроорганизмов в процессах аккумуляции Mn в ЖМО размерных фракций 1–2 и 2–3 мм. Несмотря на присутствие большого количества культивируемых форм MnOM в ЖМО более крупного размера (3–5 мм), MnOM не оказывали влияния на накопление Mn.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках гранта № 23-24-00255, <https://rscf.ru/project/23-24-00255/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аристовская Т. В. Роль микроорганизмов в мобилизации и закреплении железа в почвах // Почвоведение. 1975. № 4. С. 290–295.
- Астафьева М. М., Жегалло Е. А., Ривкина Е. М., Самылина О. С., Розанов А. Ю., Зайцева Л. В., Авдонин В. В., Карпов Г. А., Сергеева Н. Е. Бактериальная палеонтология. М.: Российская академия наук, 2021. 124 с.

- Водяницкий Ю. Н. Гидроксиды железа в почвах // Почвоведение. 2010. № 11. С. 1341–1352.
- Vodyanitskii Y. N. Iron hydroxides in soils: a review of publications // Euras. Soil Sci. 2010. V. 43. P. 1244–1254. <https://doi.org/10.1134/S1064229310110074>
- Зайдельман Ф. Р., Никифорова А. С. Генезис и диагностическое значение новообразований почв лесной и лесостепной зон. М.: МГУ им. М. В. Ломоносова, 2001. 216 с.
- Захарова, Ю.Р., Парфенова В. В. Метод культивирования микроорганизмов, окисляющих железо и марганец в донных отложениях озера Байкал // Известия РАН. Сер. биол. 2007. № 3. С. 290–295.
- Звягинцев Д. Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: МГУ, 1991. 304 с.
- Классификация и диагностика почв России. Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.
- Костенков Н. М. Окислительно-восстановительные режимы в почвах периодического переувлажнения (Дальний Восток). М.: Наука, 1986.
- Логинова О. О., Данг Т. Т., Белоусова Е. В., Грабович М. Ю. Использование штаммов рода *Acinetobacter* для биоремедиации нефтезагрязненных почв на территории Воронежской области // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2011. № 2. С. 127–133.
- Лысак В. В. Микробиология. Минск: БГУ, 2007. 426 с.
- Лысак Л. В., Кадулин М. С., Конова И. А., Лапыгина Е. В., Иванов А. В., Звягинцев Д. Г. Численность, жизнеспособность и таксономический состав наноформ бактерий в железо-марганцевых конкрециях // Почвоведение. 2013. № 6. С. 707–714.
- Lysak L. V., Kadulin M. S., Konova I. A., Lapygina E. V., Ivanov A. V., Zvyagintsev D. G. Population number, viability, and taxonomic composition of the bacterial nanoforms in iron-manganic concretions // Euras. Soil Sci. 2013. V. 46. P. 668–675. <https://doi.org/10.1134/S1064229313060069>
- М-02-0604-2007. Методика выполнения измерений массовой доли кремния, кальция, титана, ванадия, хрома, бария, марганца, железа, никеля, меди, цинка, мышьяка, стронция, свинца, циркония, молибдена, в порошковых пробах почв и донных отложений рентгеноспектральным методом с применением энергодисперсионных рентгенофлуоресцентных спектрометров типа EDX фирмы “Shimadzu”. СПб., 2007. 17 с.
- Мартынова М. В. Формы нахождения марганца, их содержание и трансформация в пресноводных отложениях // Экологическая химия. 2012. Т. 21. С. 38–52.
- Пиневиц А. В. Микробиология железа и марганца. СПб.: СПбГУ, 2005. 374 с.
- Пуртова Л. Н., Тимофеева Я. О. Изучение некоторых свойств и активности каталазы агротемногумусовых подбелов при различных видах агротехнического воздействия // Почвоведение. 2022. № 10. С. 1277–1289.
- Purtova L. N., Timofeeva Ya. O. Study of some properties and catalase activity in albic stagnosols under different agrogenic impacts // Euras. Soil Sci. 2022. V. 55. P. 1436–1445. <https://doi.org/10.1134/S1064229322100131>
- Пуртова Л. Н., Тимофеева Я. О. Характеристика мелкозема и ортштейнов агрогенных почв южной части Приморского края: физико-химические, оптические свойства, каталазная и каталитическая активность // Почвоведение. 2021. № 12. С. 1481–1491.
- Purtova L. N., Timofeeva Y. O. Fine earth and nodules in agrogenic soils from the south of Primorskii region: physicochemical and optical properties, catalase and catalytic activity // Euras. Soil Sci. 2021. V. 54. P. 1855–1863. <https://doi.org/10.1134/S1064229321120097>
- Росликова В. И. Марганцево-железистые новообразования в почвах равнинных ландшафтов гумидной зоны. Владивосток: Дальнаука, 1996. 291 с.
- Тимофеева Я. О. Накопление и фракционирование микроэлементов в почвенных железо-марганцевых конкрециях различного размера // Геохимия. 2008. № 3. С. 293–301.
- Timofeeva Y. O. Accumulation and fractionation of trace elements in soil ferromanganese nodules of different size // Geochem. Int. 2008. V. 46. P. 260–267. <https://doi.org/10.1134/S0016702908030038>
- Тимофеева Я. О., Голов В. И. Аккумуляция микроэлементов в ортштейнах почв // Почвоведение. 2010. № 4. С. 434–444.
- Timofeeva Y. O., Golov V. I. Accumulation of microelements in iron nodules in concretions in soils: a review // Euras. Soil Sci. 2010. V. 43. P. 401–407. <https://doi.org/10.1134/S1064229310040058>
- Федорюк Е. Д., Няникова Г. Г. Выделение культур железо- и марганец-окисляющих микроорганизмов // Наука и образование в современной конкурентной среде. 2015. № 1. С. 3–8.
- Холопов Ю. А. Изучение реакции микроорганизмов почв лесных ценозов на внесение солей свинца и кадмия в условиях модельного опыта // Известия Самарского научного центра РАН. 2013. Т. 15. С. 260–267.
- Щапова Л. Н. Микрофлора почв юга Дальнего востока России. Владивосток: ДВО РАН, 1994. 186 с.
- Ainiwaer A., Liang Y., Ye X., Gao R. Characterization of a novel Fe²⁺ activated non-blue laccase from *Methylobacterium extorquens* // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. Art. 9804. <https://doi.org/10.3390/ijms23179804>
- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Andreini C., Bertini I., Cavallaro G., Holliday G. L., Thornton J. M. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles // J. Biol. Inorg. Chem. 2008. V. 13. P. 1205–1218. <https://doi.org/10.1007/s00775-008-0404-5>
- Cappelletti M., Presentato A., Piacenza E., Firrincieli A., Turner R. J., Zannoni D. Biotechnology of *Rhodococcus* for the production of valuable compounds // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 8567–8594. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10861-z>
- Ciancio C. L., Piazza A., Masotti F., Garavaglia B. S., Ottado J., Gottig N. Manganese oxidation counteracts the deleterious effect of low temperatures on biofilm formation

- in *Pseudomonas* sp. MOB-449 // Front. Mol. Biosci. 2022. V. 9. Art. 1015582. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1015582>.
- Cornu S., Deschatrettes V., Salvador-Blanes S., Clozul B., Hardy M., Branchut S., Forestier L. L. Trace element accumulation in Mn-Fe-oxide nodules of a planasolic horizon // Geoderma. 2005. V. 125. P. 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.06.009>
- Cotroneo S., Schiffbauer J. D., McCoy V.E., Wortmann U. G., Darroch S. A., Peng Y., Laflamme M. A new model of the formation of Pennsylvanian iron carbonate concretions hosting exceptional soft-bodied fossils in Mazon Creek, Illinois // Geobiology. 2016. V. 14. P. 543–555. <https://doi.org/10.1111/gbi.12197>
- Dabard M. P., Loi A. Environmental control on concretion-forming processes: examples from Paleozoic terrigenous sediments of the North Gondwana margin, Armorican Massif (Middle Ordovician and Middle Devonian) and SW Sardinia (Late Ordovician) // Sediment. Geol. 2012. V. 267–268. P. 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2012.05.013>
- Dourado M. N., Camargo Neves A. A., Santos D. S., Araújo W. L. Biotechnological and agronomic potential of endophytic pink-pigmented methylotrophic *Methylobacterium* spp. // BioMed Res. Int. 2015. Art. 909016. <https://doi.org/10.1155/2015/909016>.
- Emenike C. U., Agamuthu P., Fauziah S. H. Blending *Bacillus* sp., *Lysinibacillus* sp. and *Rhodococcus* sp. for optimal reduction of heavy metals in leachate contaminated soil // Environ. Earth Sci. 2016. V. 75. Art. 26. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4805-9>
- Ettler V., Chren M., Mihaljevič M., Drahotka P., Kříbek B., Veselovský F., Sracek O., Vaněk A., Penížek V., Komárek M., Mapani B., Kamona F. Characterization of Fe-Mn concentric nodules from Luvisol irrigated by mine water in a semi-arid agricultural area // Geoderma. 2017. V. 299. P. 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.03.022>
- Fischel M. H.H., Clarke C. E., Sparks D. L. Synchrotron resolved microscale and bulk mineralogy in manganese-rich soils and associated pedogenic concretions // Geoderma. 2023. V. 430. Art. 116305. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2022.116305>
- Frawley E. R., Fang F. C. The ins and outs of bacterial iron metabolism // Mol. Microbiol. 2014. V. 93. P. 609–616. <https://doi.org/10.1111/mmi.12709>
- Gasparatos D. Fe-Mn concretions and nodules to sequester heavy metals in soils // Environ. Chem. Sust. World. 2012. V. 2. P. 443–474. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2439-6_11
- Gasparatos D., Massas I., Godelitsas A. Fe-Mn concretions and nodules formation in redoximorphic soils and their role on soil phosphorus dynamics: current knowledge and gaps // Catena. 2019. V. 182. Art. 104106. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2019.104106>
- Ghosh P. K., Maiti T. K., Pramanik K., Ghosh S. K., Mitra S., De T. K. The role of arsenic resistant *Bacillus aryabhatai* MCC3374 in promotion of rice seedlings growth and alleviation of arsenic phytotoxicity // Chemosphere. 2018. V. 211. P. 407–419. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.148>
- Gupta R. S., Patel S., Saini N., Chen S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 5753–5798. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>
- Hu C., Zhang Y., Zhang L., Luo W. Effects of microbial iron reduction and oxidation on the immobilization and mobilization of copper in synthesized Fe(III) minerals and Fe-rich soils // J. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 24. P. 534–544. <https://doi.org/10.4014/jmb.1310.10001>
- Hu M., Li F., Lei J., Fang Y., Tong H., Wu W., Liu C. Pyrosequencing revealed highly microbial phylogenetic diversity in ferromanganese nodules from farmland // Environ. Sci. Process. Impacts. 2015. V. 17. P. 213–224. <https://doi.org/10.1039/c4em00407h>
- Jofré I., Matus F., Mendoza D., Nájera F., Merino C. Manganese-oxidizing Antarctic bacteria (Mn-Oxb) release reactive oxygen species (ROS) as secondary Mn(II) oxidation mechanisms to avoid toxicity // Biology. 2021. V. 10. Art. 1004. <https://doi.org/10.3390/biology10101004>
- Kepkay P. E., Nealson K. H. Growth of a manganese oxidizing *Pseudomonas* sp. in continuous culture // Arch. Microbiol. 1987. V. 148. P. 63–67. <https://doi.org/10.1007/BF00429649>
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 35. P. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Lane D. J., Pace B., Olsen G. J., Stahl D. A., Sogin M. L., Pace N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 6955–6959. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6955>
- Li J., Guo Y. K., Zhao Q. X., He J. Z., Zhang Q., Cao H. Y., Liang C. Q. Microbial cell wall sorption and Fe-Mn binding in rhizosphere contribute to the obstruction of cadmium from soil to rice // Front. Microbiol. 2023. V. 14. Art. 1162119. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1162119>
- Li-Mei Z., Liu F., Tan W., Feng X., Zhu Y., He J. Microbial DNA extraction and analyses of soil iron–manganese nodules // Soil Biol. Biochem. 2008. V. 40. P. 1364–1369. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.01.004>
- Liu C., Massey M. S., Latta D. E., Xia Y., Li F., Gao T., Hua J. Fe(II)-induced transformation of iron minerals in soil ferromanganese nodules // Chem. Geol. 2021. V. 559. Art. 119901. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2020.119901>
- Lysak L., Konova I., Lapygina E., Soina V., Chekin M. Filtered forms of prokaryotes and bacteriophages in soil concretions // IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci. 2019. V. 368. Art. 012030. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/368/1/012030>
- Lyu J., Yu X., Jiang M., Cao W., Saren G., Chang F. The mechanism of microbial-ferromanganese nodule interaction and the contribution of biomineralization to the formation of oceanic ferromanganese nodules // Microorganisms. 2021. V. 9. Art. 1247. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061247>

- Powell M. M., Rao G., Britt R. D., Rittle J. Enzymatic hydroxylation of aliphatic c-h bonds by a Mn/Fe cofactor // bioRxiv: the preprint server for biology. 2023. Art. 532131. <https://doi.org/10.1101/2023.03.10.532131>
- Schulz M. S., Vivit D., Schulz Ch., Fitzpatrick J., White. A. Biologic origin of iron nodules in a marine terrace chronosequence, Santa Cruz, California // Soil Sci. Soc. Am. J. 2010. V. 74. P. 550–564. <https://doi.org/10.2136/sssaj2009.0144>
- Shahid M., Zeyad M. T., Syed A., Singh U. B., Mohamed A., Bahkali A. H., Elgorban A. M., Pichtel J. Stress-tolerant endophytic isolate *Priestia aryabhatai* BPR-9 modulates physio-biochemical mechanisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) for enhanced salt tolerance // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2022. V. 19. Art. 10883. <https://doi.org/10.3390/ijerph191710883>
- Singh R., Grigg J. C., Qin W., Kadla J. F., Murphy M. E., Eltis, L. D. Improved manganese-oxidizing activity of DypB, a peroxidase from a lignolytic bacterium // ACS Chem. Biol. 2013. V. 8. P. 700–706. <https://doi.org/10.1021/cb300608x>
- Sipos P., Kovacs I., Balazs R., Toth A., Barna G., Mako A. Micro-analytical study of the distribution of iron phases in ferromanganese nodules // Geoderma. 2022. V. 405. Art. 115455. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2021.115445>
- Suhr M., Raff J., Pollmann K. Au-interaction of Slp1 polymers and monolayer from *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 — QCM-D, ICP-MS and AFM as tools for biomolecule-metal studies // J. Vis. Exp. 2016. V. 107. Art. e53572. <https://doi.org/10.3791/53572>
- Tan W. F., Liu F., Li Y. H., Hu H. Q., Huang Q. Y. Elemental composition and geochemical characteristics of iron-manganese nodules in main soils of China // Pedosphere. 2006. V. 16. P. 72–81. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(06\)60028-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(06)60028-3)
- Timofeeva Y. O., Karabtsov A., Ushkova, M., Burdukovskii M., Semal V. Variation of trace element accumulation by iron-manganese nodules from Dystric Cambisols with and without contamination // J. Soils Sediments. 2021. V. 21. P. 1064–1078. <https://doi.org/10.1007/s11368-020-02814-w>
- Timofeeva Y. O., Karabtsov A. A., Semal' V.A., Burdukovskii M. L., Bondarchuk N. V. Iron-manganese nodules in udepts: the dependence of the accumulation of trace elements on nodule size // Soil Sci. Soc. Am. J. 2014. V. 78. P. 767–778. <https://doi.org/10.2136/sssaj2013.10.0444>
- Zhang L. M., Liu F., Tan W. F., Feng X. H., Zhu Y., He J. Microbial DNA extraction and analyses of soil iron-manganese nodules // Soil Biol. Biochem. 2008. V. 40. P. 1364–1369. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.01.004>

EXPERIMENTAL ARTICLES

Taxonomic Composition of Cultured Fe-and Mn-oxidizing Bacteria and Microbial Abundance in Fe-Mn Nodules of Different Sizes

Ya. O. Timofeeva¹, E. S. Martynenko^{1, 2, *}, M. L. Sidorenko¹, A. V. Kim^{1, 2}, and V. M. Kazarin¹

¹Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

²Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690922 Russia

*e-mail: martynenko98@inbox.ru

Received October 9, 2023 revised October 18, 2023; accepted October 20, 2023

Abstract—Taxonomic diversity and quantitative distribution of cultured forms of Fe- and Mn-oxidizing microorganisms in Fe-Mn nodules of different sizes and fine earth of Gleyic Luvisols formed in the territory not affected by direct anthropogenic impact, were analyzed. The results were obtained using a combination of microbiological, molecular and analytical methods and noninvasive techniques. Most of the microorganisms which were cultured from the nodules were Mn oxidizers. Bacteria of the genera *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, and *Priestia* were identified in the nodules. Quantitative distribution of Fe- and Mn-oxidizing microorganisms in the outer and inner zones of the nodules of different sizes demonstrated that Mn-oxidizing microorganisms were involved in all stages of nodules formation and development, while Fe-oxidizing microorganisms participated in the initial phase of their formation. Spherules and porous structures of bacterial nature were observed in the studied nodules. The host fine earth was characterized by differences in the relative abundance of the dominant microbial groups in the profile. Manganese-oxidizing bacteria were represented in the soil fine earth by the genera *Prestia* and *Methylobacterium*.

Keywords: Fe-Mn nodules, Mn-oxidizing microorganisms, Fe-oxidizing microorganisms, taxonomic composition of bacteria, Gleyic Luvisols