*На правах рукописи*

**Козяева Вероника Валерьевна**

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ, ТАКСОНОМИЯ И ГЕНОМИКА МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ

**Специальность 03.02.03 – Микробиология**

**АВТОРЕФЕРАТ**
**диссертации на соискание ученой степени**
**кандидата биологических наук**

**Москва – 2020**

Работа выполнена в лаборатории молекулярной диагностики (ЦКП «Биоинженерия») Института Биоинженерии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

| | |
|---|---|
| **Научный руководитель** | **Груздев Денис Сергеевич**<br>Кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной диагностики Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» |
| **Официальные оппоненты** | **Грабович Маргарита Юрьевна**<br>Доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии и физиологии клетки Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет»<br>**Намсараев Зоригто Баирович**<br>Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт») |
| **Ведущая организация** | Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук |

Защита состоится «_02_» апреля 2020 г. в 14-00 на заседании диссертационного совета Д 002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке Института микробиологии им.С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2 и на сайте http://fbras.ru/.
Автореферат разослан «___»_____ 20__ года.

**Ученый секретарь**
**диссертационного совета**

Доктор биологических наук
Хижняк Татьяна Владимировна

# ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

## Актуальность работы

Магнитотактические бактерии (МТБ) известны своей уникальной способностью синтезировать внутриклеточные кристаллы магнетита или грейгита, окруженные мембраной, – магнетосомы. Известно, что основные гены, контролирующие синтез магнетосом, расположены в магнетосомном геномном острове (МГО). Однако механизм формирования магнетосом до конца не изучен. Генетический контроль процесса формирования магнетосом приводит к появлению магнитных кристаллов с уникальными характеристиками: с узким распределением по размерам, видоспецифичной морфологией, идеальной кристаллической структурой и высокой степенью химической чистоты (Faivre and Schuler, 2008). Более того, на поверхности мембраны, окружающей магнетосомы, можно иммобилизировать различные биологические молекулы. Все это делает магнетосомы уникальными природными магнитными наночастицами, которые трудно воспроизвести химическими методами (Uebe and Schüler, 2016).

Благодаря уникальности свойств бактериальных магнитных наноразмерных частиц и их высокого биотехнологического потенциала изучение МТБ является актуальным (Mathuriya, 2015). Несмотря на большие перспективы в прикладной сфере, практическое применение магнетосом до сих пор является сложной задачей. Прежде всего это связано с трудностью культивирования МТБ и отсутствием высокоэффективного штамма-продуцента.

Изучение организации МГО МТБ разных таксономических групп для получения продуцентов, синтезирующих магнетосомы с заданными свойствами, является одной из основополагающих задач. Это позволит выявить и изучить ключевые гены метаболизма и синтеза магнетосом, а увеличение числа штаммов МТБ, доступных в чистых культурах, может внести значительный вклад в развитие биотехнологии МТБ.

Способность к формированию магнетосом не является таксономическим признаком. На данный момент МТБ, для которых проведено морфо-физиологическое описание, обнаружены среди представителей классов *Alpha-*, *Beta-*, *Delta-*, *‘Eta-’*, *Gammaproteobacteria* и филума *Nitrospirae*. Анализ метагеномных данных показывает наличие МТБ в составе филогенетических групп, которые ранее не были обнаружены при помощи стандартных подходов. Например, наличие таких генов обнаружено у представителей филумов ‘*Latescibacteria’* и *Planctomycetes* (Lin and Pan, 2015; Lin et al., 2017).

Сложность идентификации МТБ на основании сравнительного анализа генов 16S рРНК заключается в существовании близкородственных видов немагнитотактических бактерий. Например, ген 16S рРНК магнитотактической бактерии *Desulfovibrio magneticus* имеет 99.5% сходства с геном *Desulfovibrio carbinolicus* и 98.6% – с геном *Desulfovibrio burkinensis*, которые не способны формировать магнетосомы (Lefèvre and Bazylinski, 2013). Отсутствие референтных штаммов МТБ в различных таксономических группах также существенно затрудняет описание разнообразия МТБ на основе анализе гена 16S рРНК. Наиболее исследованы МТБ порядков *Rhodospirillales* и *Magnetococcales*. Возможно, это связано с тем, что применение стандартных методов магнитной сепарации приводит к отбору наиболее мобильных и сравнительно малых по размеру МТБ, какими и являются представители этих двух порядков. Традиционная схема выявления новых МТБ в микробных

сообществах включает этап отбора целевых клеток первичной магнитной сепарацией и обогащение магнитной фракции МТБ методами, основанными на таксисе клеток (Moench and Konetzka, 1978; Wolfe et al., 1987). Такой подход зачастую не позволяет обнаружить и охарактеризовать малоподвижные и чувствительные к высоким концентрациям кислорода МТБ. Разработка новых методов сепарации МТБ, основанных не на способности клеток двигаться к магниту за счет таксиса, и последующим применением методов метагеномики позволит выявить и изучить новые группы МТБ. Последующий анализ полученных данных позволяет не только определить видовой состав МТБ в исследуемом сообществе, но и идентифицировать гены, детерминирующие основные метаболические пути, в том числе синтез магнетосом. Эти сведения позволят расширить наши знания об эволюции магнитотаксиса и помогут в дальнейшей работе по культивированию МТБ.

**Цель и задачи исследования**

Изучение разнообразия магнитотактических бактерий пресноводных экосистем с применением комплекса микробиологических и молекулярно-биологических подходов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить филогенетическое разнообразие МТБ в пробах придонных осадков реки Москва, реки Уда и озера Белое Бордуковское.
2. Описать морфологию клеток и магнетосом МТБ выявленных филогенетических групп.
3. Выделить чистые культуры МТБ и провести их таксономическое описание.
4. Провести анализ геномных последовательностей новых культивируемых и некультивируемых МТБ.

**Научная новизна и значимость работы**

Разработана универсальная для МТБ праймерная система на функциональный ген *mamK*, который является одним из основных генов формирования магнетосом. Разработанная праймерная система позволяет идентифицировать МТБ разных таксономических групп. Предложен новый метод сепарации МТБ (MTB-CoSe) из природных образцов. Расширены представления о разнообразии МТБ. Впервые идентифицированы МТБ семейства *Syntrophaceae*. Описаны новые виды-кандидаты: ‘*Ca*. Magnetomonas plexicatena’ филума *Nitrospirae* и ‘*Ca*. Magnetaquicoccus inordinatus’ филума *Proteobacteria*. Впервые морфология пресноводного магнитотактического кокка была ассоциирована с его генотипом и показана возможность горизонтального переноса генов биоминерализации магнетосом у представителей порядка *Magnetococcales*. Описаны и таксономически узаконены два новых вида рода *Magnetospirillum* – *Ms. moscoviense* sp. nov. BB-1$^{T}$ и *Ms. kuznetsovii* sp. nov. LBB-42$^{T}$.

**Практическая значимость**

Предложенный комплексный подход для изучения МТБ на основе сепарации MTB-CoSe с последующей амплификацией тотальной ДНК сообщества с применением разработанной праймерной системы, специфичной к функциональному гену *mamK*, может быть использован для изучения разнообразия МТБ, в том числе, некультивируемых бактерий. Полученные чистые культуры рода *Magnetospirillum* могут быть использованы в качестве продуцентов магнетосом. Реконструированные

магнетосомные геномные острова могут быть использованы в синтетической биологии с целью создания рекомбинантных штаммов-продуцентов магнетосом.

**Апробация работы**

Материалы диссертации доложены и обсуждены на международных и российских конференциях: **1**. IX, XII молодежная школа-конференция с международным участием: «Актуальные аспекты современной микробиологии». Москва, Россия, 2013, 2017. **2.** 4th, 5th 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria. Rio de Janeiro, Brazil, 2014, Marseille, France, 2016, Kanazawa, Japan, 2018. **3.** XXVII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, Россия, 2015. **4**. 8th Congress of European Microbiologists FEMS2019. Glasgow, UK. 2019. **5**. 2-й Российский микробиологический конгресс. Саранск, Россия. 2019.

**Публикации**

Материалы диссертации содержатся в 13 печатных работах: 5 экспериментальных статьях и 8 тезисах конференций.

**Объем и структура**

Диссертация состоит из введения, 10 глав, заключения, выводов и 1 приложения, изложенных на 164 страницах, включая 18 таблиц, 36 рисунков и списка литературы из 229 наименований, из них 7 – на русском и 222– на английском языке.

**Место проведения работы и благодарности**

Работа выполнена в лаборатории молекулярной диагностики (ЦКП «Биоинженерия») Института биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН в период с 2012 по 2019 годы.

Автор выражает благодарность к.б.н. Кузнецову Б.Б. за руководство в первые годы выполнения работы. Автор выражает глубокую признательность к.б.н. Дзюба М.В. за обучение и помощь в работе с магнитотактическими бактериями. Определение состава жирных кислот было проведено д.б.н Осиповым Г.А. и к.х.н. Быстровой О.В. (Международный Аналитический Центр ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН). Автор выражает признательность к.б.н. Женило С.В. (ФИЦ Биотехнологии РАН) и Dr. Pedro Leão (Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Рио-де-Жанейро) за помощь в проведении FISH-ПЭМ анализа. Автор выражает благодарность к.б.н. Гайсину В.А. за предоставленную пробу из реки Уда.

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю, заведующему лабораторией молекулярной диагностики (ЦКП «Биоинженерия») к.б.н. Денису Сергеевичу Груздеву, а также всему коллективу лаборатории за всестороннюю помощь и советы при выполнении работы. Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 16-34-00802 и № 18-34-01005).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объекты исследования**

В работе были исследованы пробы воды и донных осадков из трех пресноводных источников: реки Москва, реки Уда и озера Белое Бордуковское. Проба из реки Москвы была отобрана в черте г. Москва (район Строгино) (55.8141°N,

37.4141°E) в ноябре 2012 г. Проба из реки Уды была отобрана в черте города Улан-Удэ (51.8229°N, 107.6199°E) в августе 2012 года. Проба из озера Белое Бордуковское (Шатурский район, Московская обл., 55°37'56"N, 39°44'38"E) была отобрана в октябре 2016 г. Пробы представляли собой донные осадки (1 л) и воду (2 л), отобранные с глубины около 0.5 м. Из проб формировали микрокосмы, которые инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение нескольких недель в лаборатории. Микрокосмы были обозначены как «Уда», «Москва» и «Белое Бордуковское».

**Получение обогащенной фракции клеток МТБ**

Обогащенную фракцию клеток МТБ получали с помощью метода магнитной сепарации (Moench, Konetzka, 1978). Затем с помощью метода магнитного обогащения в капилляре («race-track») проводили второй этап магнитной сепарации для очистки от немагнитотактических микроорганизмов (Wolfe et al., 1987). Для сепарации МТБ был разработан также метод магнитного обогащения на колонках MTB-CoSe (**M**agneto**T**actic **B**acteria **Co**lumn **Se**paration), который не основан на таксисе клеток (Рис. 1).

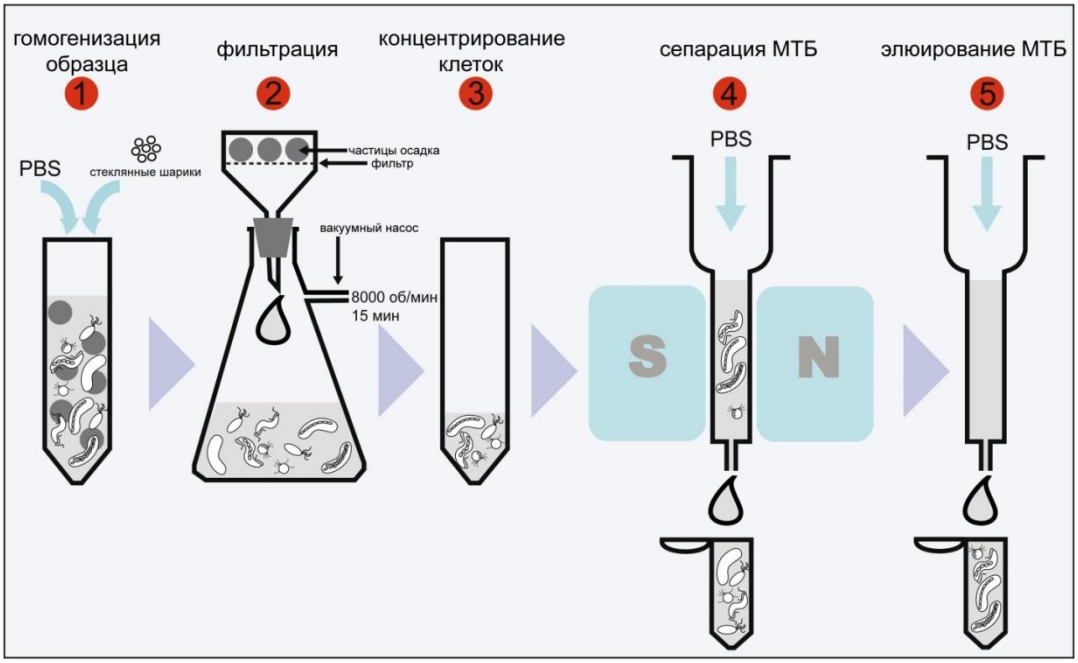


Рисунок 1. Схематическое изображение метода MTB-CoSe. 1. Стадия гомогенизации образца. 2. Стадия фильтрации от крупных илистых частиц. 3. Удаление избыточного количества жидкости центрифугированием. 4. Сорбция МТБ на магнитной колонке за счет наличия магнетосом. Промывка большим количеством стерильного буфера для удаления немагнитотактических бактерий. S и N - полюса магнита. 5. Элюирование МТБ. Колонку убирали с магнита и смывали клетки МТБ.

**Состав питательных сред и условия культивирования**

Магнитотактические бактерии культивировали на модифицированных питательных средах для *Magnetospirillum* spp.: MSGM (ATCC medium: 1653 magnetic spirillum growth medium), DSM380 (DSMZ medium № 380) и ACAM (activated charcoal agar medium) (Schultheiss and Schuler, 2003).

**Микроскопические методы**

Морфологию клеток исследовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Морфологию и состав

кристаллов магнетосом изучали с помощью просвечивающей электронной микоскопии высокого разрешения (ПЭМ ВР) при ускоряющем напряжении 200 кВ.

Для ассоциирования морфологии клетки с ее генотипом применяли метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), координированной с ПЭМ. Фиксированные в растворе 3% параформальдегида клетки МТБ наносили на индексные медные подложки, покрытые формваром. Сверху каждого образца для стабилизации наносили тонкий слой углерода (Balzers CED-030/Baltec). Буферы для флуоресцентной гибридизации готовили согласно рекомендациям (Pernthaler et al., 2001). Реакцию проводили на подложках с использованием 30% формамида в гибридизационном буфере. После этого на подложки наносили 4',6-диамидино-2-фенилиндол (ДАФИ). В качестве контроля проводили гибридизацию с универсальными зондами на домен *Bacteria* EUB338 (I, II и III), меченными Alexa 488 (Daims et al., 1999). После проведения FISH ту же самую подложку, в зоне детектированного свечения специфичного зонда, исследовали с помощью ПЭМ.

**Получение чистых культур МТБ**

Чистые культуры МТБ получали методом предельных разведений в полужидкой среде MSGM и на твердой среде ACAM. Для этого отбирали бактерии, выросшие в виде кольца в микроаэробной зоне или колонии у дна пробирки, с помощью пипетки Пастера и делали до 10 разведений в пробирках Хангейта или на чашках Петри. Колонии, выросшие на чашках Петри, пересевали в полужидкие среды DSM 380 и MSGM. Колонии, выросшие в максимальном разведении в пробирках Хангейта, подвергали очистке с помощью метода магнитного обогащения в капилляре («race-track») и дополнительной серии последовательных разведений.

**Оценка филогенетического разнообразия МТБ**

Из сепарированных клеток МТБ выделяли ДНК с помощью набора DNeasy PowerSoil kit (Qiagen, Нидерланды), с помощью модифицированного щелочного метода Бирнбойма-Доли и технологии Wizard (Promega, США) (Булыгина с соавт. 2002) и CTAB-метода (Wilson, 2001). Выделенную ДНК использовали в качестве матрицы для амплификации фрагментов гена 16S рРНК и гена *mamK*. Для получения целевого фрагмента гена *mamK* была разработана праймерная система для двухстадийной ПЦР. Для первой стадии амплификации использовали пару праймеров mamK_79F – mamK_577R, после чего полученный продукт использовали в качестве матрицы для второй стадии наработки продукта при помощи праймеров mamK_86F и mamK_521R. Ген 16S рРНК амплифицировали с использованием праймеров 27F и 1492R (Lane, 1991). Очищенные ПЦР-фрагменты генов лигировали в вектор pGEM-T EasySystem (Promega, США), и трансформировали штамм *E. coli* DH10B с помощью электропорации. Вставка гена *mamK* была секвенирована с использованием праймера M13F, гены 16S рРНК секвенировали с использованием праймеров 341F, 530F, 1114F и 519R (Lane, 1991; Sambrook et al., 1989).

**Секвенирование и сборка генома**

Библиотеку фрагментов генома конструировали при помощи набора реагентов NEBNext DNA Library Prep (Illumina, США) согласно рекомендациям производителя. Библиотеку секвенировали на приборе HiSeq 1500 (Illumina, США). Чтения, отфильтрованные по качеству, были собраны *de novo* с помощью программы SPAdes v. 3.12.0 (Bankevich et al., 2012). Аннотацию генома проводили с использованием

PGAP. Реконструкцию геномов проводили с помощью трех различных подходов (MaxBin2 (Wu et al., 2014), MyCC (Lin and Liao, 2016) и Busy Bee Web (Laczny et al., 2017)). Финальные геномные сборки получали с использованием DAS Tool (Sieber et al., 2018). Наличие контаминации и ее удаление проводили с помощью онлайн-сервиса ProDeGe (Tennessen et al., 2016) или RefineM v. 0.0.24 (Parks et al., 2017). Полноту и уровень контаминации геномных сборок оценивали с помощью CheckM v. 1.0.12 (Parks et al., 2015).

**Анализ полученных последовательностей**

Полученные *de novo* последовательности белков сравнивали с последовательностями базы данных GenBank с помощью программы BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Последовательности фрагментов генов 16S рРНК были проверены на наличие химер с помощью сервиса Bellerophon (Huber et al., 2004). GTDB-Tk v.0.1.3 toolkit использовали для поиска 120 однокопийных бактериальных маркерных генов (Parks et al., 2018). Выравнивание последовательностей проводили с помощью программ ClustalW и MAFFT (Katoh, Standley, 2013). Филогенетический анализ проводили с помощью программ MEGA5.0 (Tamura et al., 2011) и IQ-TREE (Nguyen et al., 2014). Выбор эволюционной модели осуществляли с помощью ModelFinder (Wong et al., 2017) и проводили расчет поддержки ветвей с помощью UFBoot2 (Hoang et al., 2017).

Средняя нуклеотидная идентичность (ANI) и средняя аминокислотная идентичность (AAI) были рассчитаны при помощи онлайн-сервиса ANI/AAI-Matrix (Rodriguez-R, Konstantinidis, 2016). Значения цифровой ДНК-ДНК гибридизации (dDDH) были определены с помощью онлайн-сервиса Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) 2.1 (Meier-Kolthoff et al., 2013).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе работы из микрокосмов «Москва», «Уда» и «Белое Бордуковское» были отобраны клетки МТБ с помощью магнитной сепарации. Полученные клетки были исследованы микроскопическими и молекулярно-генетическими методами, а также были использованы для выделения чистых культур МТБ.

## РАЗНООБРАЗИЕ МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ В РЕКЕ МОСКВА

### Морфология клеток МТБ, выявленных в пробах из реки Москва

Доминирующим морфотипом среди МТБ изучаемого микрокосма были кокки. На основании размеров клеток, количества цепочек и размеров магнетосом, а также наличия включений магнитотактические кокки были отнесены к 5 морфотипам (Рис. 2А-Г).

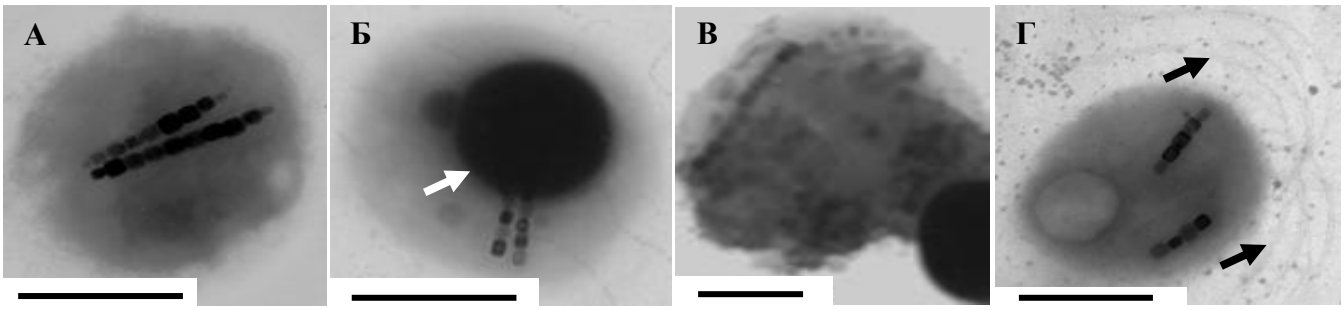


Рисунок 2. Фотографии МТБ микрокосма «Москва», полученные с помощью ПЭМ. Белые стрелки – включения, черные стрелки – жгутики. Размер линейки – 0.5 мкм.

Размеры клеток составляли 0.8–1.2 мкм. Все выявленные МТБ синтезировали удлиненные призматические кристаллы магнетосом размером 35–110 нм (по длинной оси кристалла), организованные в одну (Рис. 2В) или две (Рис. 2А, 2Б, 2Г) цепочки. Некоторые клетки содержали крупные электронно-плотные включения, вероятно, полифосфаты (Рис. 2Б). На рисунке 2Г видны 2 пучка жгутиков.

### Филогенетический анализ МТБ из реки Москва

Библиотека клонов фрагментов гена 16S рРНК включала 140 последовательностей, которые были объединены в 13 операционных таксономических единиц (ОТЕ) с уровнем сходства ≥ 98%.

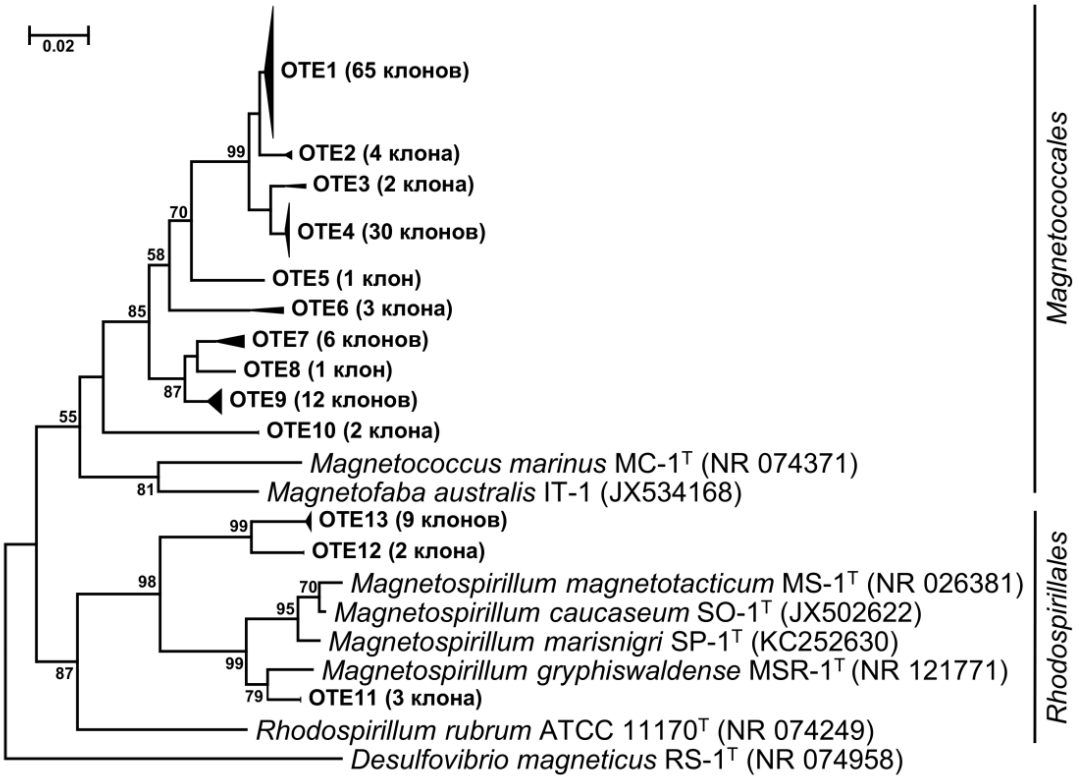


Рисунок 3. Филогенетический состав МТБ из р. Москва, выявленный посредством анализа гена 16S рРНК. Алгоритм – maximum likelihood. Достоверность ветвления проверена с помощью «bootstrap»-анализа 500 альтернативных деревьев. Шкала, 0.02 замены на нуклеотидную позицию.

Все последовательности библиотеки принадлежали представителям филума *Proteobacteria*, причем 90% всех последовательностей принадлежали бактериям порядка *Magnetococcales* (Рис. 3). Уровень сходства OTE1-OTE10 с геном 16S рРНК *Magnetococcus marinus* MC-1$^T$, ближайшего культивируемого представителя МТБ, составил около 90%. Несмотря на то, что при микроскопии другие морфотипы, кроме кокков, не были обнаружены, по результатам филогенетического анализа было выявлено наличие трех ОТЕ (OTE11-OTE13), принадлежащих бактериям порядка *Rhodospirillales*.

## РАЗНООБРАЗИЕ МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ В РЕКЕ УДА

### Получение обогащенной фракции МТБ из реки Уда и анализ их разнообразия

В результате применения магнитной сепарации в капилляре из микрокосма «Уда» были получены МТБ, морфология которых была исследована с помощью ПЭМ. Все обнаруженные МТБ имели кокковидную форму и содержали неорганизованные в цепочки магнетосомы. Библиотека клонов микрокосма «Уда» включала 71

последовательность гена 16S рРНК, которые были объединены в две ОТЕ с уровнем сходства 99%. На филогенетическом дереве полученные ОТЕ формировали отдельную ветвь внутри порядка *Magnetococcales* (Рис. 4). Одна ОТЕ, обозначенная как Magnetococcales bacterium UR-1, или сокращенно UR-1, являлась доминирующей (~87% от клональной библиотеки).

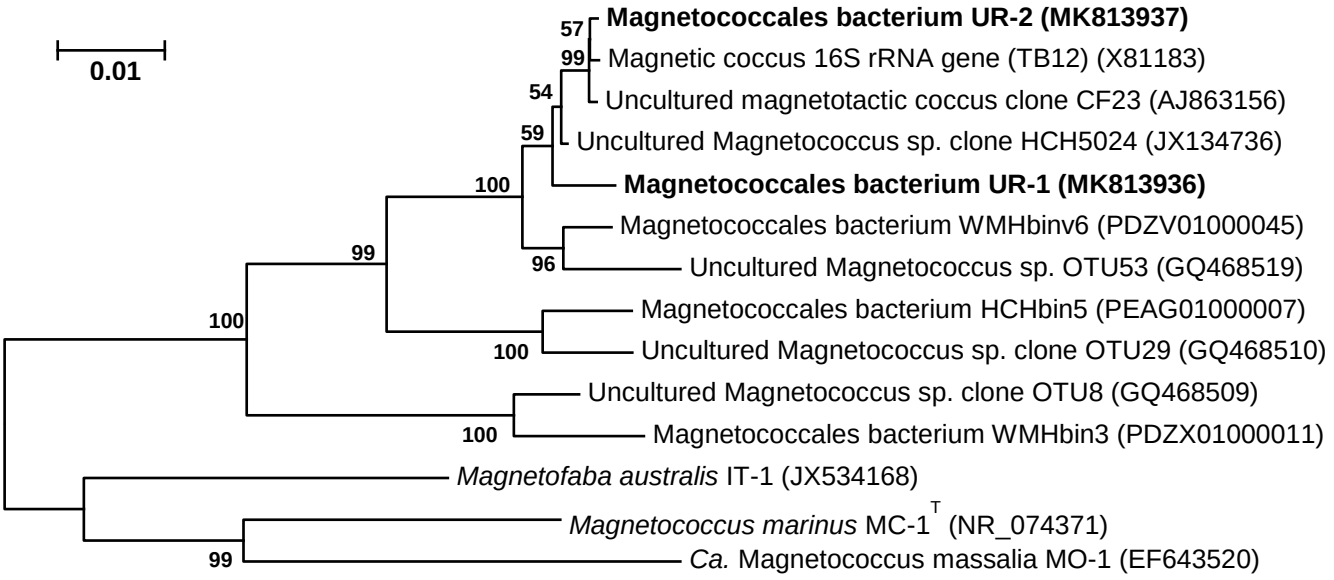


Рисунок 4. Филогенетическое дерево последовательностей гена 16S рРНК (1277 п.о.), указывающее положение ОТЕ, полученных из р. Уда, внутри порядка *Magnetococcales*. Шкала, 0.01 замена на нуклеотидную позицию.

Уровень сходства ОТЕ UR-1 с геном ближайшего валидно описанного вида *Mc. marinus* MC-1$^{T}$ составил 89.6%, что свидетельствует о возможной принадлежности ОТЕ UR-1 к новому семейству.

**Детекция представителей ОТЕ UR-1 в микробном сообществе реки Уда**

Для ОТЕ UR-1 был сконструирован специфичный зонд Uda54-3, который имел более трех несовпадений с последовательностями ОТЕ UR-2. Методом FISH, проведенным на сепарированных из микрокосма Уда клетках МТБ, показано, что специфичный для ОТЕ UR-1 зонд Uda54-3, меченный Cy3, гибридизовался с кокковидной клеткой (Рис. 5А, Б). Клетка также гибридизовалась с универсальными зондами EUB338 (Рис. 5В) и окрашивалась ДАФИ (Рис. 5Г). ПЭМ изображения этой же клетки, идентифицированной зондом Uda54-3, представлены на рисунках 5Е-5Ж. Идентифицированная клетка имела удлиненные магнетосомы (Рис. 5З) не организованные в цепочки и сгруппированные на одной стороне клетки (Рис. 5Д и 5Ж). Методом ПЭМ ВР анализа магнетосом показано, что кристаллы имеют межплоскостное расстояние между атомами равное 0.29 нм, что соответствует магнетиту (Рис. 5И). У штамма UR-1 средняя длина и ширина магнетосом составляли 77.4±11.9 нм и 46.2±7.9 нм, соответственно.

**Данные о геноме кокка UR-1**

Метагеномная ДНК сепарированных клеток МТБ микрокосма «Уда» была секвенирована. В результате сборки и биннинга данных был получен геном магнитотактического кокка UR-1. Он состоял из 546 контигов размером 4,143,644 п.о., G + C состав – 52.2 мол%. Геном UR-1 имел высокое качество (полнота сборки составляла 97.4%, контаминация – 3.8%). В собранном геноме была выявлена

последовательность гена 16S рРНК, которая была идентична последовательности доминирующей OTE UR-1. Отметим, что последовательность зонда Uda54-3 была идентична участку гена 16S рРНК, полученного из генома, что позволяет ассоциировать геном и описанные на рисунке 5 кокки UR-1.

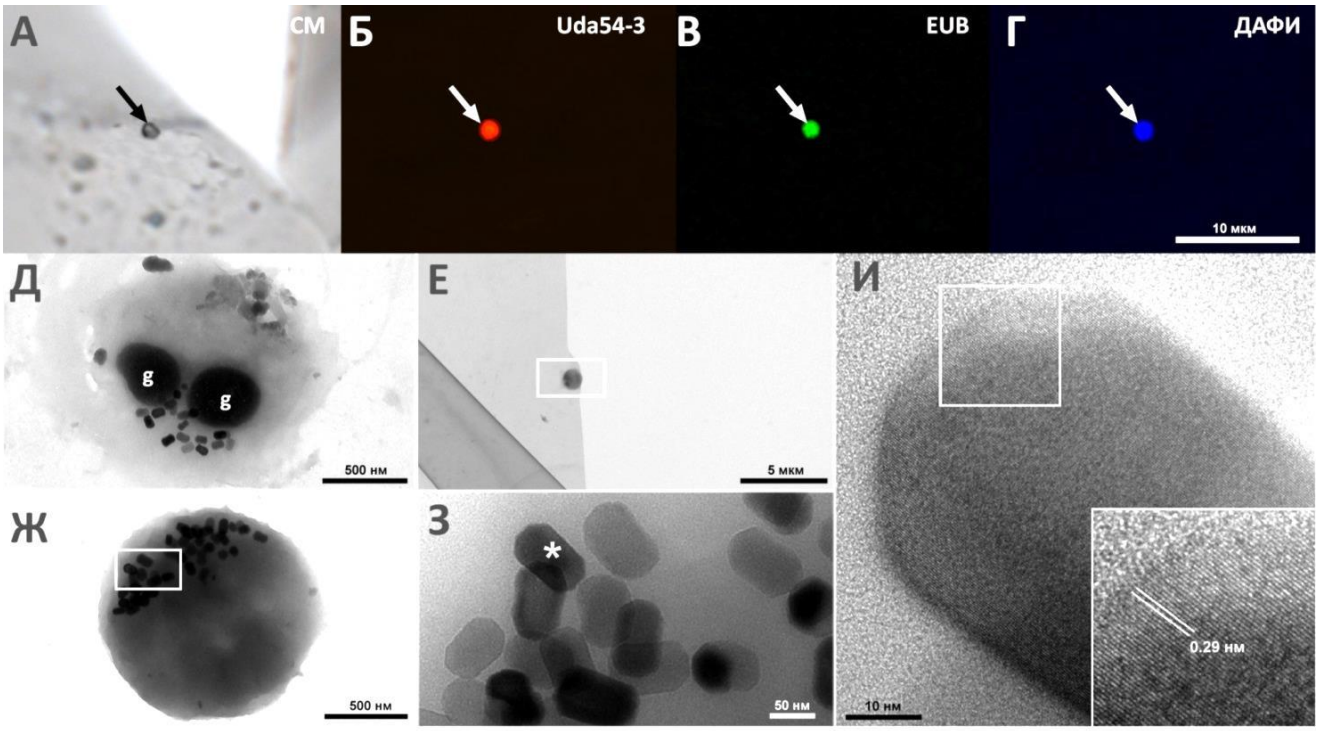


Рисунок 5. Анализ морфологии клеток OTE UR-1 и их магнетосом. А) Световая микроскопия, стрелкой указана кокковидная клетка. Б) Гибридизация с зондом Uda54-3. В) Гибридизация с зондами EUB. Г) окрашивание клетки с помощью ДАФИ. Д) ПЭМ клетки UR-1. Е) ПЭМ кокка, показанного на изображении А. Ж) Увеличенное изображение области, выделенной на рисунке Е. З) Увеличенное изображение области, выделенной на рисунке Ж. И) ПЭМ ВР магнетосомы, отмеченной звездочкой на изображении З. На вставке показано межплоскостное расстояние между атомами, равное 0.29 нм.

## Выделение семейства-кандидата '*Ca.* Magnetaquicoccaceae' в составе порядка *Magnetococcales*

Для определения филогенетического положения полученного генома UR-1 было сконструировано дерево на основе аминокислотных последовательностей 120 конкатенированных белков корового генома доступных представителей порядка *Magnetococcales*. На филогеномном дереве штаммы порядка *Magnetococcales* формировали 5 ветвей, которые были поддержаны высокими значениями «bootstrap» (100%) (Рис. 6А). Культивируемые морские штаммы MO-1, IT-1 и MC-1$^{T}$ семейства *Magnetococcaceae*, как и на дереве генов 16S рРНК, формировали отдельную ветвь. Выявленные 5 клад, возможно, представляют пять семейств внутри порядка *Magnetococcales*. Для подтверждения обозначенных семейств были проведены дополнительные исследования доступных геномов представителей порядка *Magnetococcales*.

Анализ AAI показал, что значения идентичности между магнитотактическими кокками находились в пределах от 50.1 до 99.0% (Рис. 7).

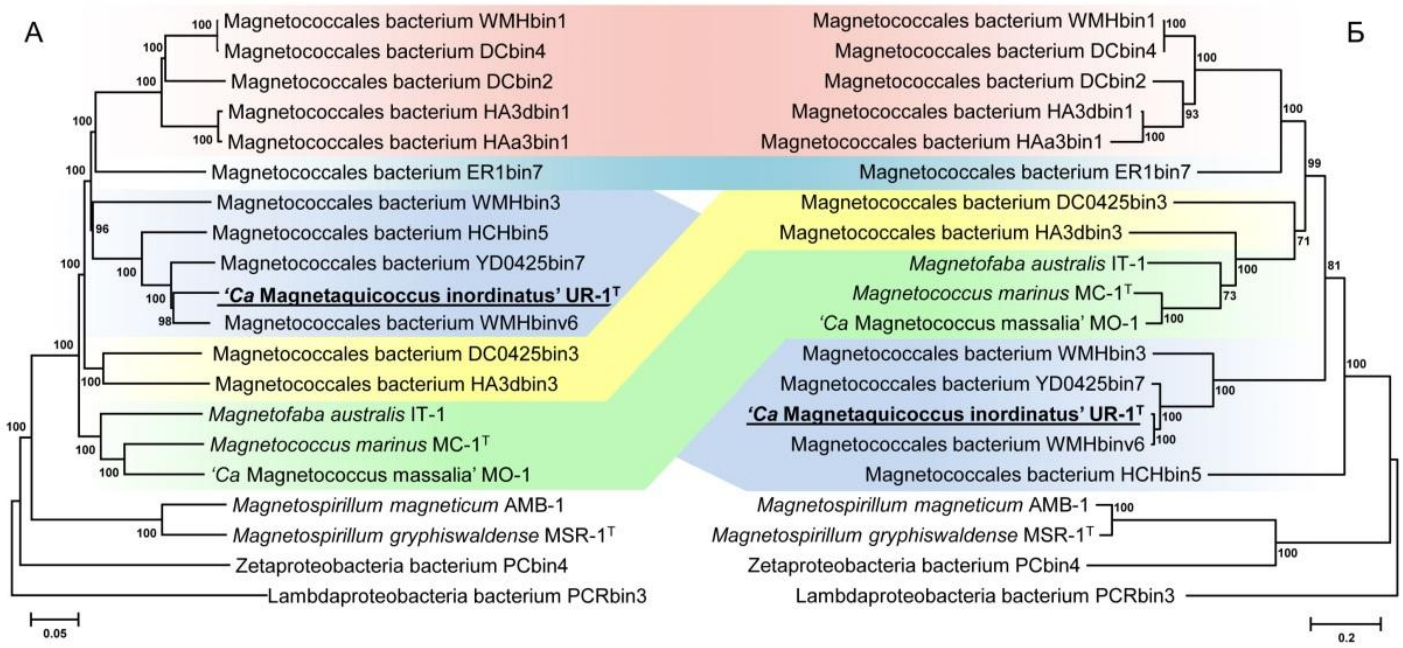


Рисунок 6. Сравнение филогенетических деревьев, построенных на основе А) 120 конкатенированных однокопийных белков *Magnetococcales*, и Б) конкатенированных последовательностей белков биоминерализации магнетосом (MamABEIKLMOPST). Алгоритм maximum-likelihood. Шкала, 0.05 замен на аминокислотную позицию.

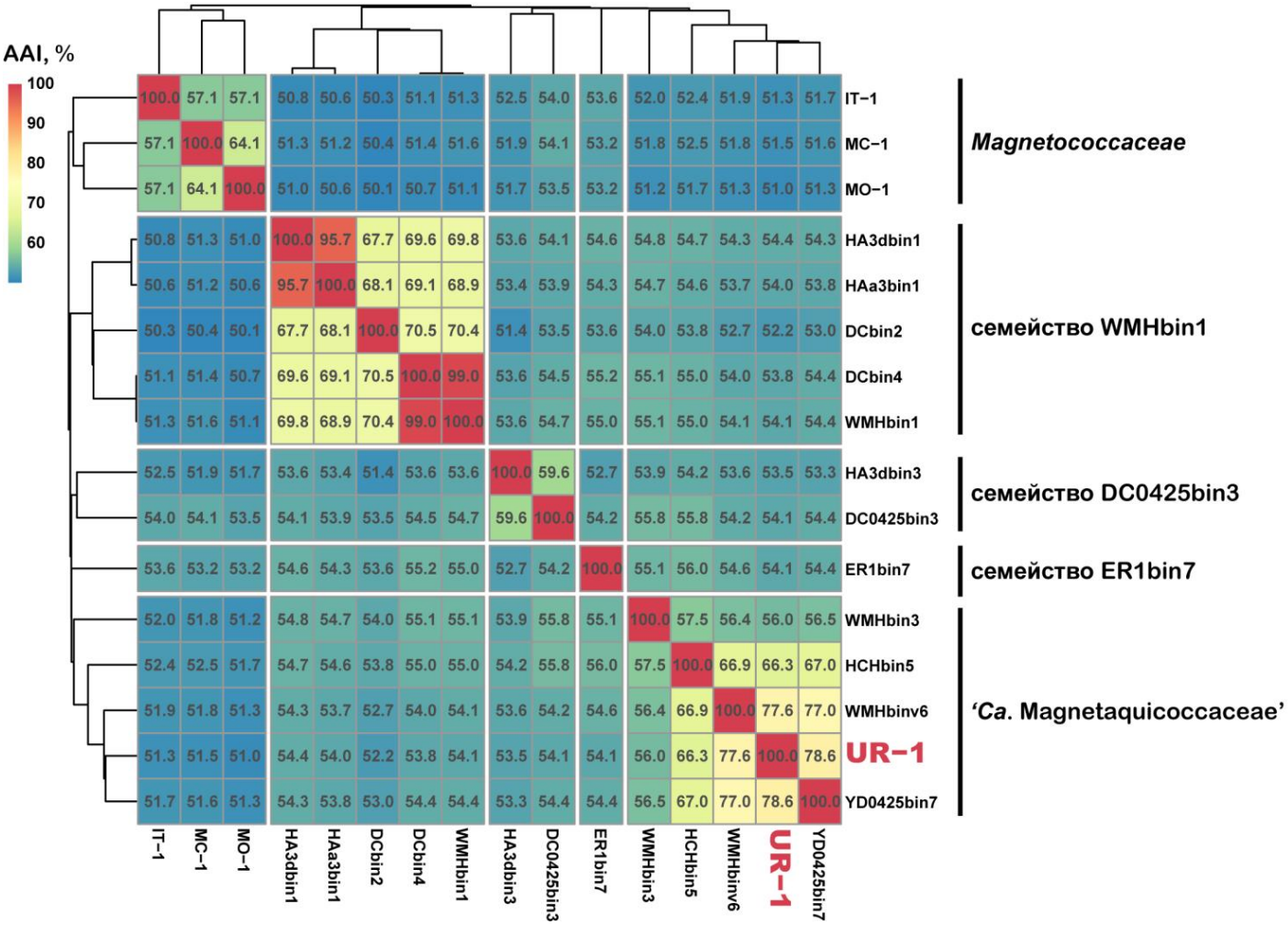


Рисунок 7. Тепловая карта попарных сравнений значений AAI между геномами представителей порядка *Magnetococcales*. Линиями разграничены предполагаемые семейства. Черные линии, расположенные справа, указывают предлагаемое название семейства.

Согласно рекомендациям (Konstantinidis et al., 2017), значения AAI для представителей семейства составляют 45–65% и для представителей рода – 65–95%. Однако, величина AAI не имеет четких границ для разделения таксонов высоких рангов (Konstantinidis and Tiedje, 2005; Luo et al., 2014) и эти значения при необходимости могут быть скорректированы (Konstantinidis et al., 2017). Например, при реклассификации порядка *Methylococcales* нижние границы для разделения родов принимались на уровне 70% и выше (Orata et al., 2018), а при реклассификации класса *Epsilonproteobacteria* средние значения границы между представителями разных семейств составляли 63–65% (Waite et al., 2017). Применение значений 55–56% AAI для разделения семейств коррелировало с порядком ветвления филогеномного дерева и подтверждало возможность выделения 5 семейств внутри порядка *Magnetococcales*. Культивируемые представители рода *Magnetococcus*, MC-1$^{T}$ и MO-1, имели значение AAI равное 64.1 %, которое находится на границе разделения родов. При применении границы разделения родов AAI 64–65%, внутри клады UR-1 было выделено 2 рода: в первый входили UR-1, YD0425bin7, WMHbin6 и HCHbin5, ко второму роду принадлежал штамм WMHbin3. Таким образом, внутри порядка *Magnetococcales* было выделено новое семейство-кандидат, которому было предложено название ‘*Ca*. Magnetaquicoccaceae’, и род-кандидат ‘*Ca*. Magnetaquicoccus’, к которым принадлежал кокк UR-1. Анализ ANI и dDDH показал, что UR-1 представляет новый вид-кандидат, которому было предложено название ‘*Ca*. Magnetaquicoccus inordinatus’.

**Гены биоминерализации магнетосом кокка UR-1**

В геноме UR-1был идендифицирован генный кластер МГО, который содержал 17 генов, имеющих высокий уровень сходства с магнетосомными *mam* и *mms* генами (Рис. 8). Генный кластер *mamAB* имел организацию схожую с таковой у штаммов MC-1$^{T}$, IT-1 и MO-1, за исключением наличия у UR-1 гена *mamN*. Обнаружен также кластер *mamHIE*, рядом с которым были идентифицированы гены *mmsF*-like и *mamD*-like. Между кластерами *mamAB* и *mamHIE* расположен ген (*maq1*), кодирующий белок с неопределенной функцией и не имеющий гомологии ни с одним из белков в базе GenBank. Кроме того, были выявлены различия в организации кластеров магнетосомных генов в геномах представителей разных семейств. Кластер генов *mamCXZ* не был обнаружен в геноме UR-1, также как и гены *mamA*-like и *mms6*, присутствующие в геномах *Magnetococcaceae* и представителей других трех семейств.

В результате сравнения филогенетических деревьев, реконструированных на основании конкатенированных последовательностей Mam белков и белков корового генома была выявлена их неколлинеарность (Рис. 5). На филогенетическом дереве магнетосомных генов UR-1 кластеризовался вместе с WMHbin6, UD0425bin7 и WMHbin3 (Рис. 6Б), однако их клада являлась внешней по отношению к ветвям, образованным другими кокками. Кроме этого конкатенат магнетосомных белков кокка HCHbin5, образовывал отдельную от всех ветвь и не кластеризовался с представителями своего рода. Полученные результаты свидетельствуют о том, что у представителей порядка *Magnetococcales* происходил горизонтальный перенос магнетосомных генов.

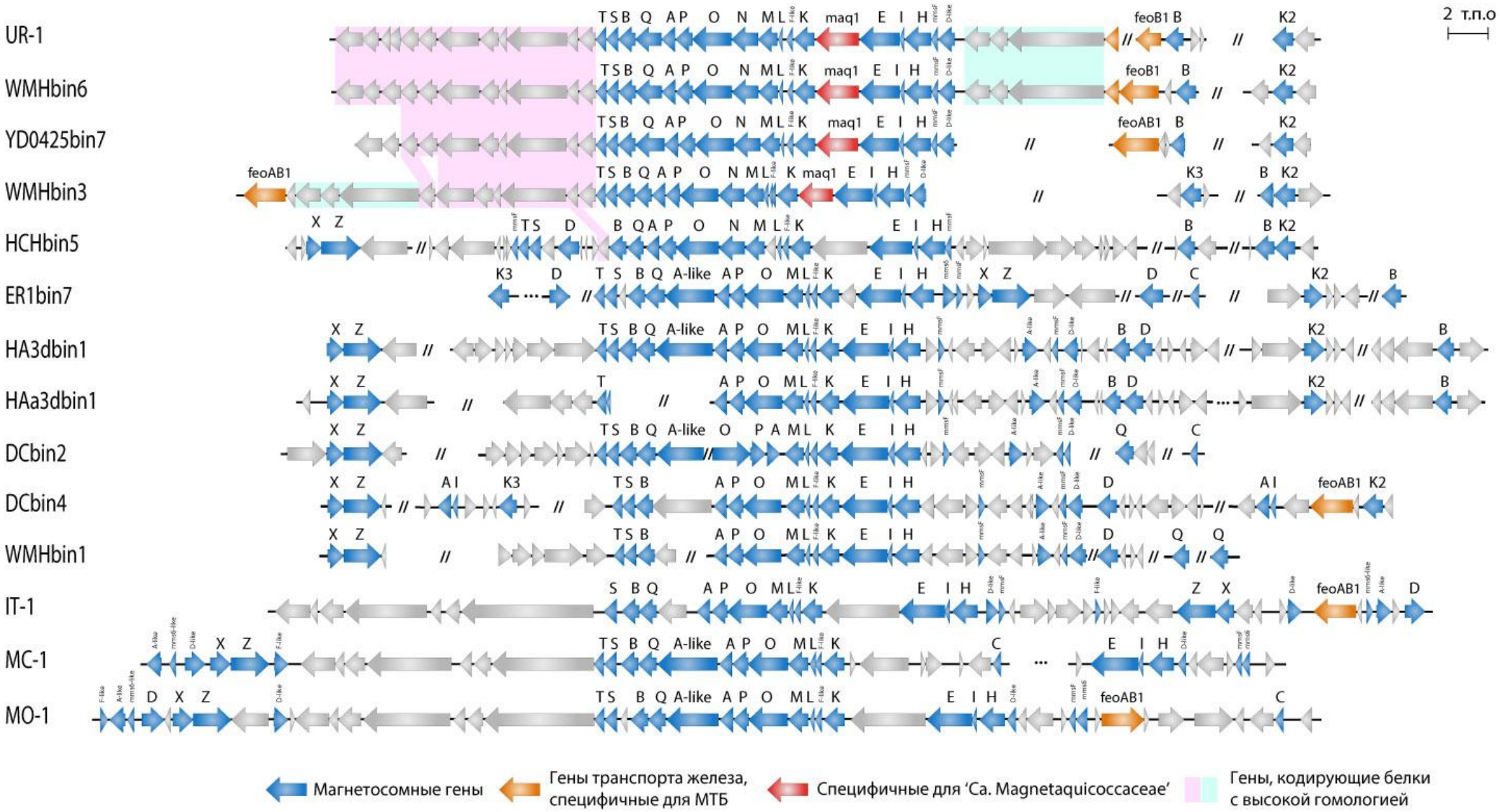


Рисунок 8. Организация генов биоминерализации магнетосом у МТБ порядка *Magnetococcales*.

На филогенетическом дереве была также замечена высокая идентичность магнетосомных белков у близкородственных кокков UR-1 и WMHbinv6. Геномы этих двух кокков, а также близкого к ним представителя YD0425bin7, были исследованы с помощью стратегии RecentHGT (Li et al., 2018). В результате на гистограмме распределения ANI для близкородственных видов UR-1 и WMHbin6 был идентифицирован выходящий за пределы кривой вероятности дополнительный пик, включающий гены с аномально высоким уровнем идентичности (95–100%) (Рис. 9).

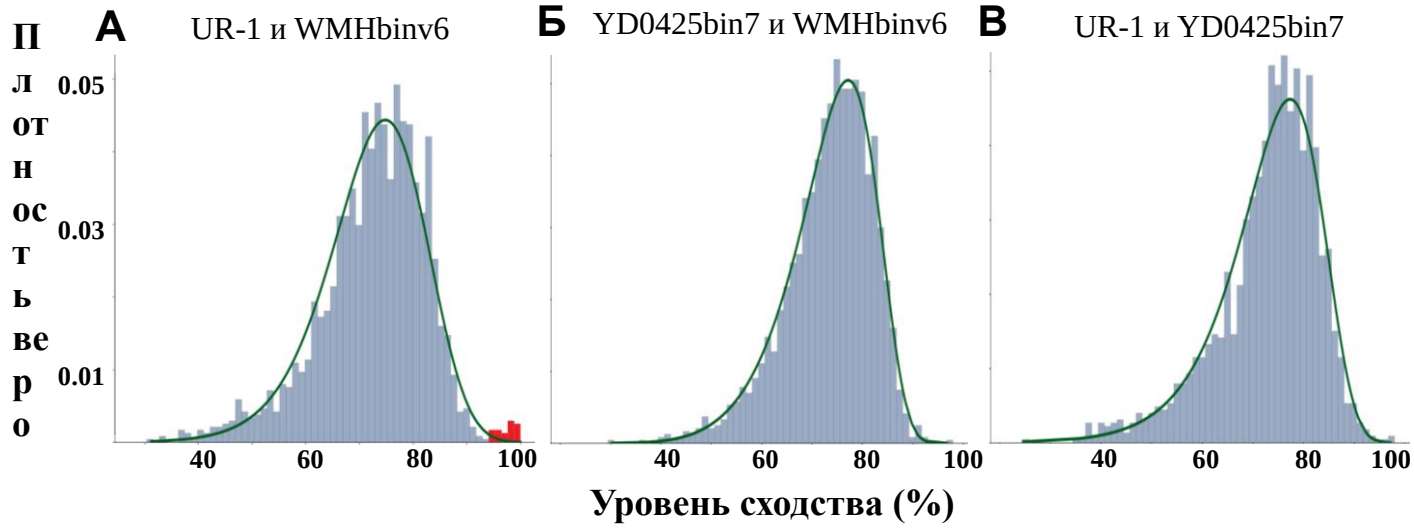


Рисунок 9. Результаты попарного сравнения последовательностей общих генов между А) YD0425bin7 и UR-1. Б) YD0425bin7 и WMHbin6. В) WMHbin6 и UR-1. Зеленая линия показывает границы распределения Вейбулла. Распределение уровня сходства последовательностей ортологичных и горизонтально перенесенных генов выделено синим и красным соответственно.

Такой аномально высокий уровень идентичности генов свидетельствует о событии недавнего горизонтального переноса. Все гены, образовавшие на гистограмме аномальный пик, находились внутри МГО. Таким образом, полученные нами результаты указывают на то, что у представителей UR-1 и WMHbinv6 произошел недавний горизонтальный перенос магнетосомных генов.

## РАЗНООБРАЗИЕ МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ ОЗЕРА БЕЛОЕ БОРДУКОВСКОЕ

При изучении разнообразия МТБ в природных источниках наиболее часто выявляют представителей порядков *Magnetococcales* и *Rhodospirillales*. Это может быть связано с тем, что имеющиеся на данный момент подходы к изучению МТБ дают преимущество именно этим группам МТБ. Нами были предложены новые подходы к сепарации клеток МТБ из природных образцов и предложена специфичная праймерная система для идентификации МТБ. Комбинированием этих методов было изучено разнообразие МТБ озера Белое Бордуковское.

### Разработка новых подходов к изучению разнообразия МТБ

Среди магнетосомных генов только 9 (*mamA, -B, -M, -Q, -O, -I, -P, -K, -E*) присутствуют в геномах всех групп МТБ. В результате сравнительного анализа было выявлено, что только ген *mamK* сочетал в себе приемлемый уровень консерватизма и полиморфности, чтобы служить универсальной молекулярной мишенью для идентификации МТБ. На основе анализа консервативных регионов гена *mamK* были спроектированы праймерные системы обеспечивающие амплификацию данного гена в результате двухстадийной ПЦР. При тестировании праймерной системы на чистых

культурах магнитотактических спирилл и на ДНК кокка ‘*Ca*. Magnetaquicoccus inordinatus’ был получен продукт нужного размера в 440 п.о. В то время как при тестировании на немагнитотактических *Ms. aberrantis* и *E. coli* продукт не образовывался. Секвенирование полученных ПЦР-продуктов показало, что произошла амплификация целевого фрагмента гена *mamK*.

Для того чтобы избежать избирательной селекции МТБ при сепарации был разработан новый метод магнитного обогащения на колонках MTB-CoSe. Сначала было проведено тестирование на чистой культуре *Ms. magneticum* AMB-1, смешанной с клетками *E. coli* в соотношении 1:3. По результатам тестирования было детектировано разделение суспензии клеток – *E. coli* удалялись с промывочной жидкостью, в то время как AMB-1 задерживалась в колонке за счет наличия внутри нее магнетосом. Затем с помощью этого метода были сконцентрированы клетки МТБ из микрокосма «Белое Бордуковское». Световой микроскопией было выявлено наличие МТБ в количестве $1.12 \pm 0.06 \times 10^6$ клеток, полученных из 20 мл исходного образца. Среди сепарированных клеток преобладали вибрионы, также были обнаружены клетки овоидной формы. Полученные клетки были разделены на 2 части: из одной была выделена ДНК, которую использовали для секвенирования метагенома и создания библиотек последовательностей генов *mamK* и 16S рРНК. Вторую часть фиксировали для FISH-ПЭМ исследований.

**Филогенетическое разнообразие МТБ в оз. Белое Бордуковское**

Библиотеки клонов фрагментов генов *mamK* и 16S рРНК сообщества МТБ из озера Белое Бордуковское состояли из 346 и 282 последовательностей, соответственно, которые были объединены в OTE с уровнем сходства ≥ 98%. В результате филогенетического анализа было показано, что OTE LBB_01, LBB_02 и LBB_03 принадлежали филуму *Nitrospirae* (Рис. 10). OTE LBB_01 являлась доминирующей (87% и 89% от клонотек *mamK* и 16S рРНК, соответственно). Минорными группами являлись OTE LBB_05 и LBB_06, которые на обоих деревьях располагались в кластерах генов МТБ порядков *Magnetococcales* и *Rhodospirillales*, соответственно.

Одним из интересных результатов было наличие OTE LBB_04, так как уровень сходства с *mamK* геном Nitrospirae bacterium MYbin3 составлял всего 69.2% при покрытии в 45%. В результате поиска ближайших гомологов LBB_04 в базе данных IMG (в метагеноме 3300021602) был найден белок, имеющий высокую идентичность (97%). В результате биннинга метагенома был получен бин (MAG_21602_syn32), содержащий целевую последовательность *mamK*, а также 16S рРНК. Последовательность OTE LBB_04 вместе с последовательностью 16S рРНК, полученной из бина MAG_21602_syn32 формировали ветвь с представителями семейства *Syntrophaceae*. Уровень сходства с ближайшими валидно описанными штаммами *Syntrophus aciditrophicus* и *Smitella propionica* составил 93.5% и 91.2%. Ранее представителей МТБ в этой таксономической группе обнаружено не было.

Таким образом, с помощью разработанной праймерной системы на ген *mamK* были выялены МТБ различных таксономических групп, в том числе неизвестных ранее. Полученные результаты говорят о применимости разработанных методов для изучения разнообразия МТБ.

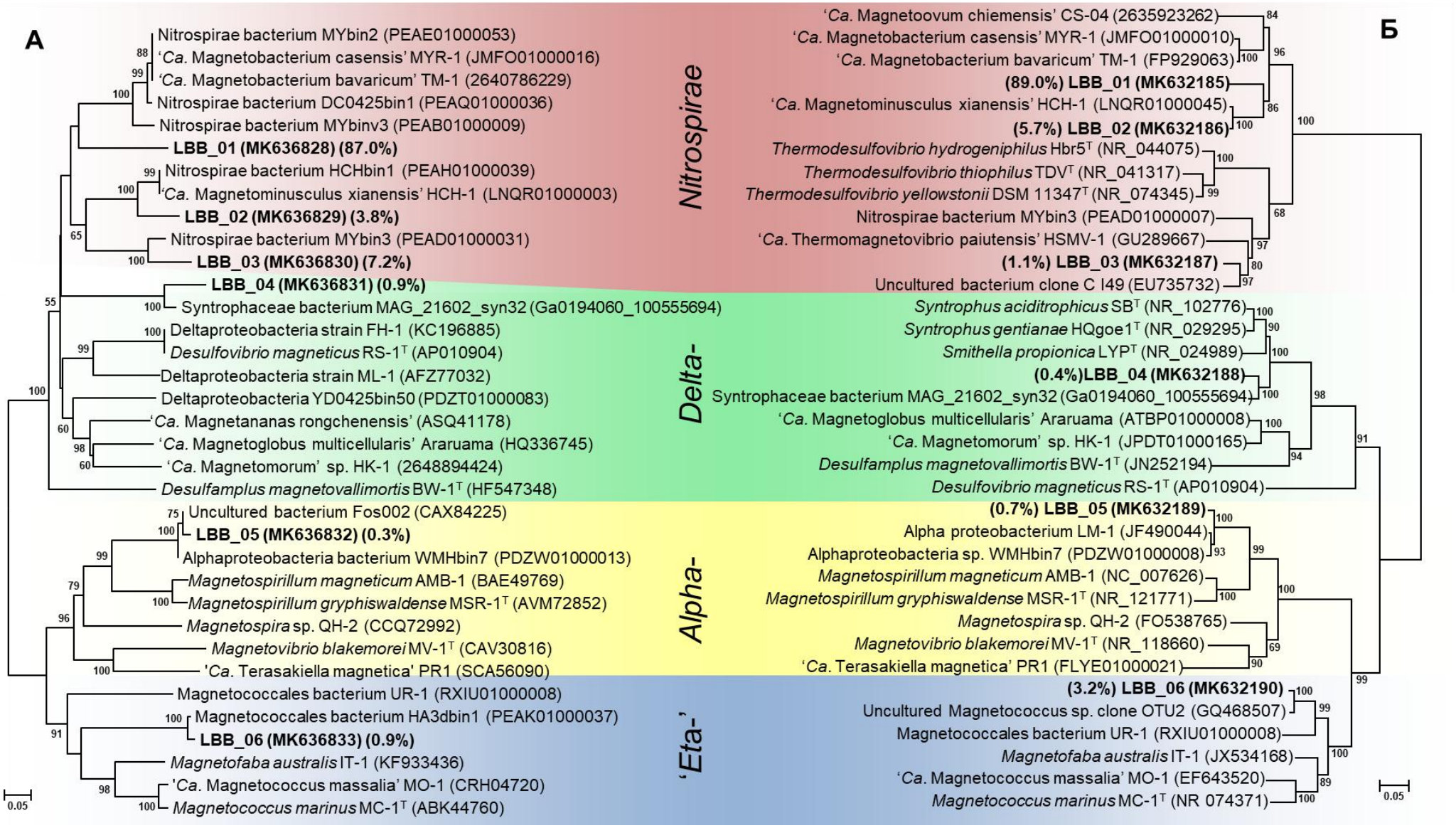


Рисунок 10. Дендрограммы основанные на последовательностях белка MamK (А) и гена 16S рРНК (Б) клональных библиотек МТБ из оз. Белое Бордуковское. Алгоритм maximum-likelihood. Шкала, 0.05 замен на аминокислотную позицию и 0.05 замен на нуклеотидную позицию.

## Идентификация морфологии представителей новых групп МТБ

Чтобы соотнести филогенетические данные с морфотипом бактерии, был выполнен FISH-ПЭМ анализ. Зонд LBB_03 был соотнесен с вибриоидной клеткой, формирующей одну цепь анизотропных магнетосом (Рис. 11А-Д). Зонд LBB_02 гибридизовался с небольшой клеткой овоидной формы, формирующей две цепочки магнетосом с анизотропными кристаллами (Рис. 11Е-К). Зондом LBB_04 была идентифицирована МТБ в форме палочки с дезорганизованными магнетосомами, расположенными близко к центру бактериальной клетки (Рис. 11Л-П).

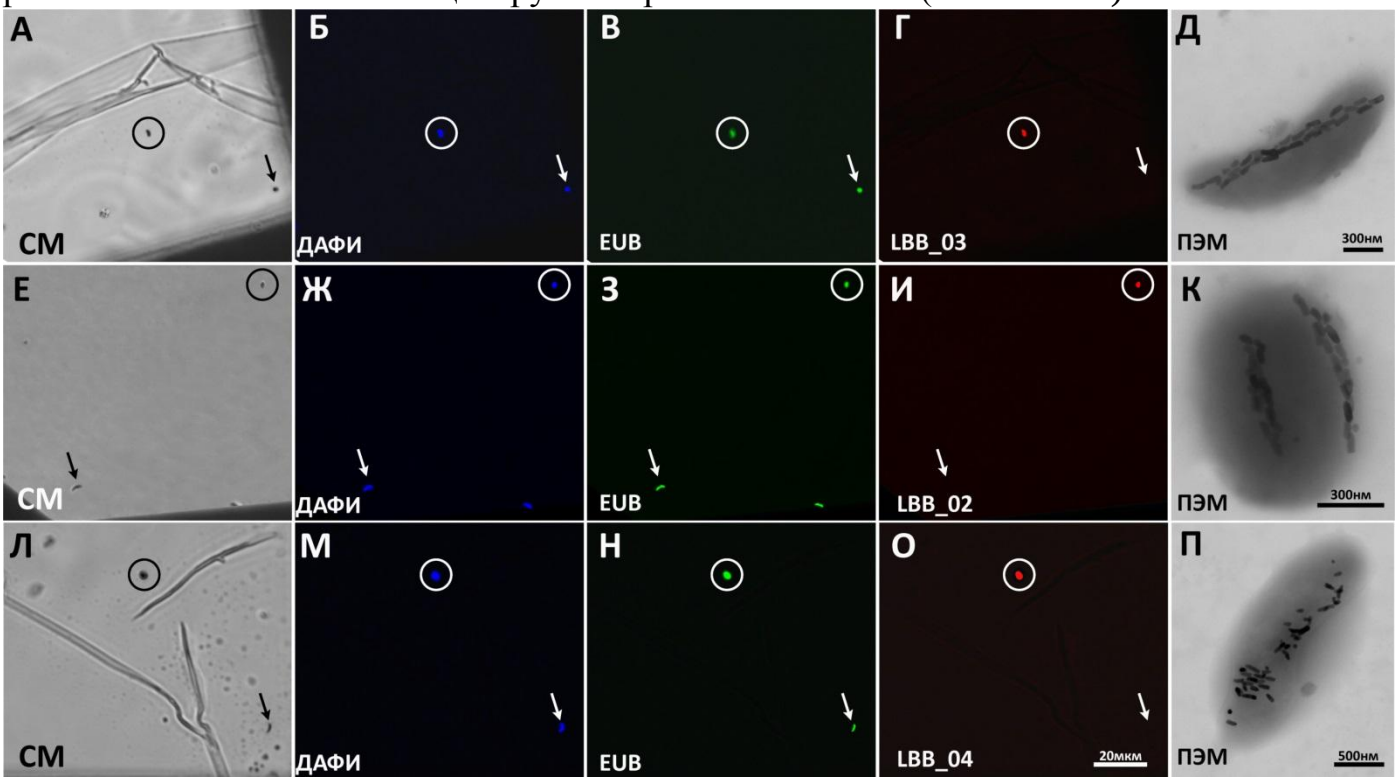


Рисунок 11. Результаты FISH-ПЭМ МТБ озера Белое Бордуковское. Кружками выделена клетка, гибридизованная со специфичным зондом. Стрелки указывают на клетку, которая не гибридизуется со специфичным зондом. А, Е и Л) Фазовый контраст. Б, Ж и М) Окрашивание ДАФИ. В, З и Н) Гибридизация бактериальных клеток с зондом EUB. Г, И и О) Гибридизация со специфичными зондами. Д,К и П) ПЭМ изображения гибридизованных клеток, изображенных на Г, И и О соответственно.

## Описание доминирующей OTE LBB_01 в качестве нового вида-кандидата '*Ca.* Magnetomonas plexicatena'

Зонд LBB_01 гибридизовался только с вибриоидными бактериями, как показано на рисунке 12А-Г. Изображения ПЭМ, показали, что эта группа МТБ формировала двойную цепочку магнетосом, которая расположена вдоль длинной оси клетки (Рис. 12Д). Наблюдаемые магнетосомы были анизотропными (Рис. 12Е). Кристаллическая структура магнетосомы соответствовала магнетиту (Рис. 12Ж).

Была секвенирована метагеномная ДНК, полученная из сепарированных клеток МТБ. Был реконструирован геном доминирующей группы LBB_01 в результате биннинга метагеномных данных. Он состоял из 1154 контигов общей длиной 2.3 млн п.о (полнота 65.15%, контаминация - 1.87%). G + C состав составлял 42.1 мол%.

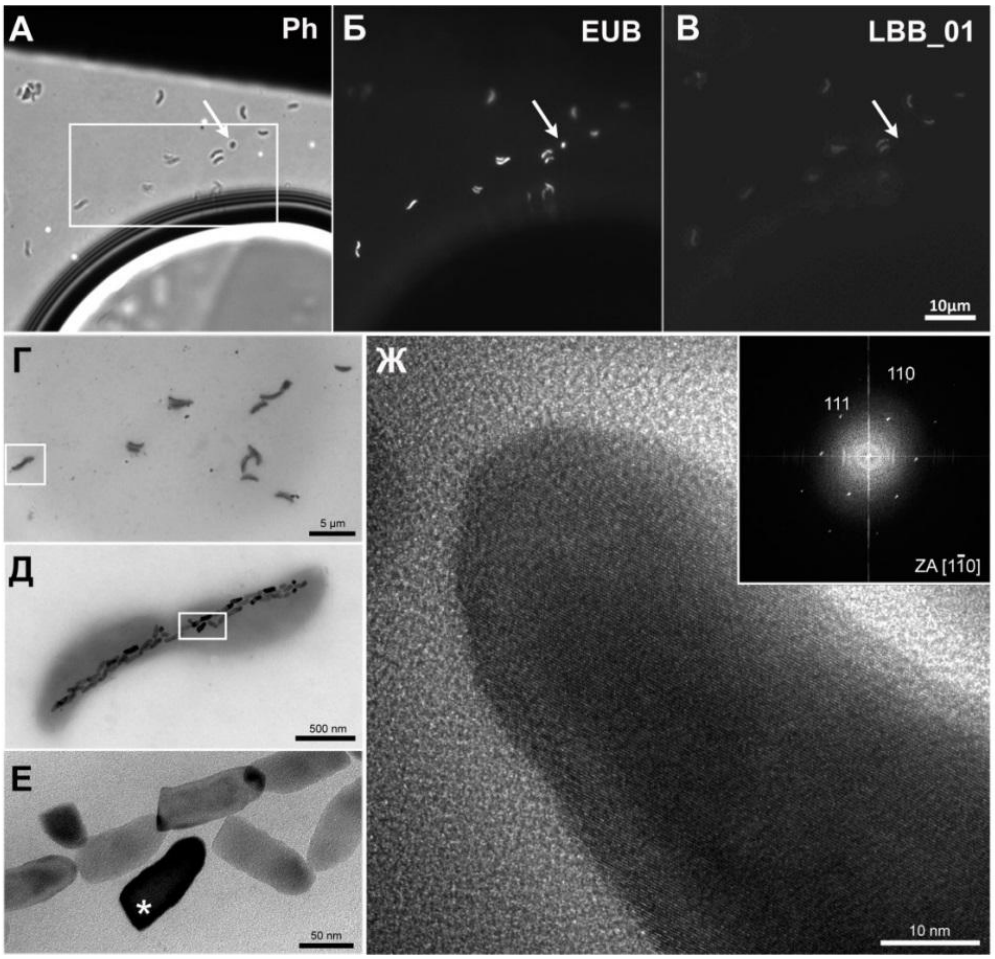


Рисунок 12. Результаты FISH-ПЭМ доминирующей группы МТБ LBB_01. А) фазовый контраст. Б) Гибридизация с зондом EUB. В) Гибридизация со специфичным зондом LBB_01. Стрелка указывает на небольшой кокк, присутствующий в образце, который не был гибридизован с зондом. Г) ПЭМ изображение региона, помеченного на рисунке А. Д) Увеличение площади, выделенной на рисунке Г. Е) Увеличение области внутри квадрата на рисунке Д. Ж) ПЭМ ВР магнетосомы, отмеченной звездочкой на рисунке Е. На вкладке указано БПФ кристаллической структуры магнетосомы.

С целью определения филогенетического положения полученного генома было постоено филогеномное дерево (Рис. 13Б), на котором геном LBB_01 и геномы представителей рода *Thermodesulfovibrio* образовывали отдельную ветвь от *Nitrospira moscoviensis* NSP M-1$^{T}$. Внутри этой ветви геном LBB_01, вместе с другими МТБ кластеризовался отдельно от рода *Thermodesulfovibrio*. Как и на дереве, построенном на основании последовательности гена 16S рРНК, LBB_01 формировал отдельную от ‘*Ca*. Magnetobacterium’ и ‘*Ca*. Magnetominusculus’ ветвь.

Различие в 8% по последовательности гена 16S рРНК с бактериями рода-кандидата ‘*Ca*. Magnetobacterium’ позволяет отнести штамм к новому кандидатному роду и виду внутри семейства-кандидата ‘*Ca*. Magnetobacteriaceae’. К семейству ‘*Ca*. Magnetobacteriaceae’ на данный момент относятся рода-кандидаты ‘*Ca*. Magnetobacterium’, ‘*Ca*. Magnetoovum’, ‘*Ca*. Magnetominusculus’, включающие МТБ имеющих специфичную для своего рода морфологию клеток (палочка, крупный овоид, маленький овоид, соответственно). Штамм LBB_01 имеет вибриоидную форму и формирует 1 «пучок» пулевидных магнетосом. Таким образом, на основании филогеномного анализа и различий в морфологии с ближайшими родственными организмами штамм LBB_01 может быть определен в качестве нового вида- и рода-кандидатов внутри семейства ‘*Ca*. Magnetobacteriaceae’. Ему было предложено название ‘*Ca*. Magnetomonas plexicatena’.

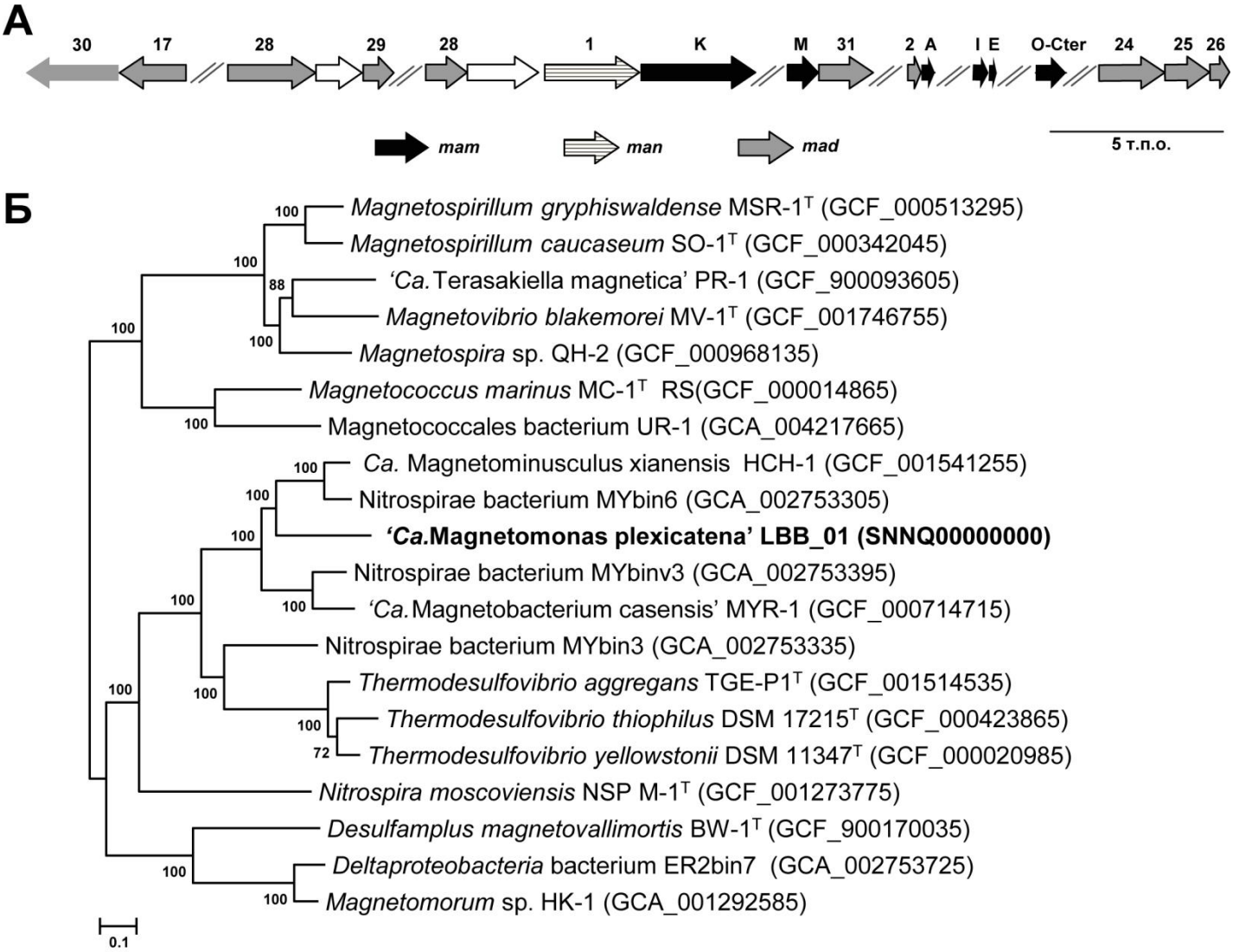


Рисунок 13. Результаты анализа генома '*Ca*. Magnetomonas plexicatena'. А) Гены биоминерализации магнетосом, идентифицированные в геноме LBB_01. Б) Филогенетическое дерево, построенное на основе конкатенированных аминокислотных последовательностей коровых белков. Указано филогенетическое положение 'Ca. Magnetomonas plexicatena'. Алгоритм maximum-likelihood. Шкала, 0.1 замена на аминокислотную позицию.

При анализе генома LBB_01 были выявлены гены, кодирующие 17 белков биоминерализации магнетосом, находящиеся в нескольких контигах (Рис. 13А). Среди них были найдены несколько генов основного оперона *mamAB*. Их сравнительный анализ показал, что наиболее идентичными к ним являлись гены, кодирующие магнетосомные белки представителей филума *Nitrospirae*.

Помимо основного оперона также были найдены 13 *mad* генов, характерных для магнитотактических *Deltaproteobacteria* и *Nitrospirae* (Lefèvre et al., 2013b). Был найден ген *man1*, который характерен для МТБ филума *Nitrospirae* (Lin et al., 2014b). Он находился рядом с *mamK*, что схоже с организацией магнетосомного острова у '*Ca*. Magnetobacterium casensis' MYR-1. Опероны *mamGFDC*, *mamXY* and *mms6*, характерные для представителей класса *Alphaproteobacteria*, не были обнаружены.

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПИСАНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ

Для всех исследуемых микрокосмов были проведены работы по выделению чистых культур МТБ. В результате были выделены 2 штамма магнитотактических спирилл: BB-1 из р.Москва и LBB-42 из оз. Белое Бордуковское. Филогенетический анализ генов 16S рРНК новых штаммов и имеющихся в GenBank последовательностей позволил отнести новые штаммы к роду *Magnetospirillum* класса *Alphaproteobacteria* (Рис. 14). Ген 16S рРНК штамма BB-1 имел 97.3% сходства с геном ближайшего валидно описанного вида *Ms. gryphiswaldense* MSR-1$^T$. Штамм LBB-42 был наиболее близок виду *Ms. marisnigri* SP-1$^T$ (98.1% сходства).

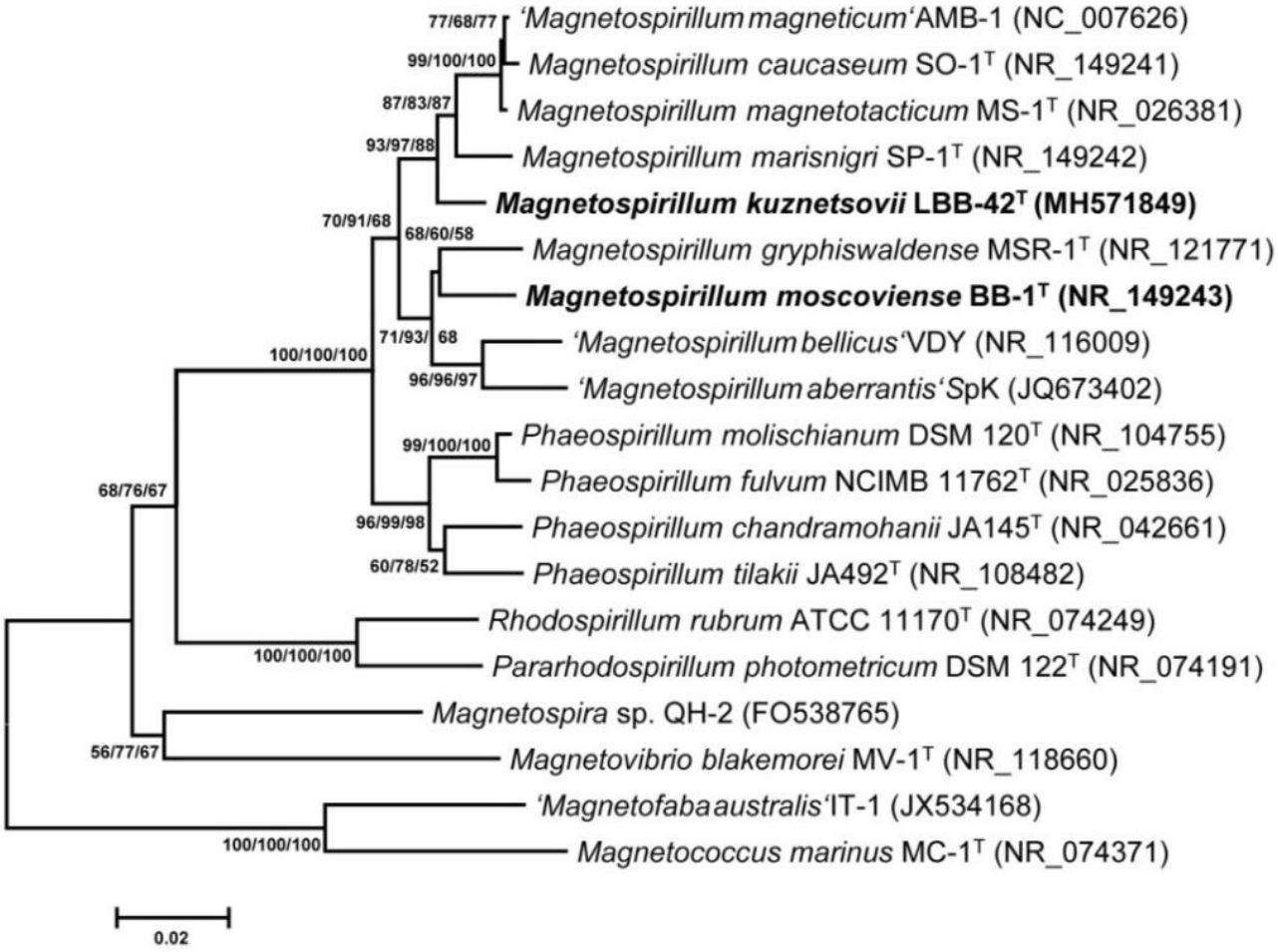


Рисунок 14. Филогенетическое дерево полных последовательностей гена 16S рРНК, указывающее положение выделенных штаммов внутри семейства *Rhodospirillaceae*. Шкала, 0.01 замена на нуклеотидную позицию.

В составе жирных кислот (ЖК) выделенных бактерий преобладали C16:1$_\omega$7*c*, C16:0 и C18:1$_\omega$9/C18:1$_\omega$7. Кислота C18:0, которая является одной из основных у большинства членов рода *Magnetospirillum,* в том числе и у штамма BB-1, у LBB-42 имела низкое содержание.

Выделенные штаммы имели следующие общие черты с представителями рода *Magnetospirillum*: форма спирилл, на обоих концах клетки находилось по 1 жгутику, синтезировали единственную цепочку кубооктаэдрических магнетосом, состоящих из магнетита, основной тип метаболизма – гетеротрофный; способны использовать ацетат, малат, пируват, лактат, сукцинат и не растут на сахарах, этаноле и цитрате, используют кислород и нитрат в качестве конечных акцепторов электронов. Основные

дифференцирующие характеристики выделенных штаммов и типовых представителей рода *Magnetospirillum* приведены в Таблице 1.

Таблица 1 - Основные дифференцирующие признаки бактерий рода *Magnetospirillum*. SP-1$^T$ – *Ms. marisnigri*, SO-1$^T$ – *Ms. caucaseum*, MS-1$^T$ – *Ms. magnetotacticum*, AMB-1 – *Ms. magneticum*, MSR-1$^T$ – *Ms.gryphiswaldense*

| Характеристика | **LBB-42** | SP-1$^T$ | SO-1$^T$ | MS-1$^T$ | AMB-1 | MSR-1$^T$ | **BB-1** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Длина клетки, мкм | **1.7-3.6** | 2.5-4.0 | 1.2-3.0 | 4-6 | ~3 | 1-20 | **2.0-4.0** |
| Ширина клетки, мкм | **0.5** | 0.3-0.4 | 0.3 | 0.2-0.4 | 0.4-0.6 | 0.7 | **0.3** |
| Диапазон температур (оптимум), (°C) | **22-33 (30)** | 18-42 (28) | 18-42 (28-30) | 15-37 (30) | - (28-34) | - ( 28-34) | **18-38 (25-32)** |
| Диапазон pH (оптимум) | **5.75-8.0 (5.9-6.7)** | 6.0-8.0 (6.5-6.8) | 6.2-8.2 (6.5-6.8) | - (7.0-7.5) | 5.0-8.2 (7.0-7.5) | - (7-7.5) | **5.5-8.5 (6.5-6.8)** |
| Отношение к солености (NaCl,%) | **<0.1** | <0.1 | <1 | <1 | <1 | НД | **<1** |
| Каталазная активность | - | - | - | - | - | + | - |
| Оксидазная активность | - | - | + | - | + | + | + |
| Отношение к кислороду † | ++ | + | ++ | + | +++ | +++ | ++ |
| Использование субстратов: | | | | | | | |
| Тартрат | - | + | + | + | + | - | + |
| Пропионат | - | + | + | - | НД | - | + |
| Бутират | - | + | + | - | + | + | + |
| Глицерин | - | - | + | - | - | - | + |
| Тиосульфат | - | - | - | - | НД | + | - |

+, используют; -, не используют; НД, нет данных.
† +, Облигатный микроаэрофил (способны к росту при концентрации кислорода в газовой фазе ≤5 %); ++, растут при контакте с воздухом только в присутствии восстанавливающего агента в среде; +++, могут расти при полной аэрации.

## Секвенирование и анализ геномов штаммов BB-1 и LBB-42

Определены нуклеотидные последовательности геномов штаммов LBB-42 и BB-1. Геном штамма LBB-42 состоял из 70 контигов общим размером 4 411 256 пар оснований. Нуклеотидная последовательность генома BB-1 составляла 4 164 497 п.н. заключенных в 207 контигов. G + C состав геномов штаммов LBB-42 и BB-1 составлял 63.4 и 65.2 мол%, соответственно. Были рассчитаны ANI и dDDH между геномами выделенных штаммов и типовых представителей рода *Magnetospirillum*. Полученные значения для обоих штаммов были ниже порогов разделения видов (95% для ANI и 70% для dDDH), что позволяет отнести штаммы LBB-42 и BB-1 к новым видам рода *Magnetospirillum*.

**Характеристика *Magnetospirillum moscoviense* sp. nov.**

*Magnetospirillum moscoviense* (mos.co.vi.en'se. N.L. neut.adj. *moscoviense* - относящийся к Москве, названный в честь места, где организм был впервые выделен).

Клетки в виде спирилл диаметром 0.3 мкм и длиной 2-4 мкм. Подвижны с помощью полярно расположенных жгутиков. Синтезирует магнитные частицы – магнетосомы - размером 30–40 нм, образующие одну цепочку. Наилучший рост наблюдается в микроаэрофильных условиях. Толерантен к высоким концентрациям кислорода, растет в жидкой среде при полной аэрации в присутствие тиогликолята, факультативный анаэроб. Каталаза-отрицательный, оксидаза-положительный. Хемоорганотроф. Бактерия растет в диапазоне температуры от 20 до 45°C с оптимумом при 25-32°C. Наилучший рост наблюдался при pH 6.5– 6.8.

Использует многие карбоновые кислоты (малат, фумарат, бутират, ацетат, сукцинат, лактат, пируват, пропионат, тартрат), глицерин. Не использует цитрат, сахара, спирты, тиосульфат. При анаэробном росте восстанавливает нитраты до нитрита. Показывает активность нитрогеназы при росте на среде без растворенных источников азота в гетеротрофных условиях. Состав основных жирных кислот: $C18:1_{\omega}7/C18:1_{\omega}9$ – 37.5%; $16:1_{\omega}7c$ – 25.4%;16:0 – 19.3%; 18:0 – 11.6%. Содержание G + C в геноме – 65.2 мол%.

Выделен из проб прибрежных донных осадков реки Москва в черте города Москва (Российская Федерация). Типовой штамм BB-1$^T$ депонирован в коллекции DSMZ и ВКМ (=DSM29455$^T$=ВКМ-2939$^T$).

**Характеристика *Magnetospirillum kuznetsovii* sp. nov.**

*Magnetospirillum kuznetsovii* (kuz.net.so'vi.i. N.L. gen. n. *kuznetsovii* – назван в честь Бориса Борисовича Кузнецова, положившего начало систематическому изучению МТБ в России).

Клетки спирилловидной формы, 2.7±0.94 мкм в длину и 0.5±0.08 мкм в диаметре, подвижны, биполярное жгутикование, содержат 1 цепочку кубооктаэдрических магнетосом. Наилучший рост в микроаэрофильных условиях, толерантен к высоким концентрациям кислорода (до 16%), факультативный анаэроб. Оптимальный рост при pH 5.9-6.7 и 30°C. Растет хемоорганогетеротрофно на короткоцепочечных карбоновых кислотах (ацетат, сукцинат, малат, лактат, пируват), не использует цитрат, тартрат, пропионат, бутират, сахара, тиосульфат, этанол и глицерол. Не проявляет оксидазной и каталазной активностей. Основные жирные кислоты: $C_{16:1\omega}7c$, $C_{16:0}$ и $C_{18:1\omega}9/C_{18:1\omega}7$. Содержание G + C в геноме – 63.4 мол%.

Типовой штамм LBB-42$^T$ выделен из придонного осадка озера Белое Бордуковское Шатурского района Московской области. Депонирован в коллекции ВКМ и КСТС (=VKM B-3270$^T$=КСТС 15749$^T$).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате анализа последовательностей гена 16S рРНК установлено наличие МТБ порядков *Rhodospirillales* и *Magnetococcales* в пробах из р. Москва и р. Уда. В обоих случаях магнитотактические кокки порядка *Magnetococcales* значительно доминировали. Такой результат может быть связан с избирательностью метода магнитной сепарации в капилляре («race-track»), который был использован для сепарации МТБ из этих двух изучаемых микрокосмов.

В настоящей работе предложен новый подход к изучению МТБ, в котором сепарация клеток не основана на их таксисе – метод магнитной сепарации на колонках (MTB-CoSe). Предложена система праймеров на маркерный ген *mamK* МТБ. Комбинацией этих методов было определено разнообразие МТБ в оз. Белое Бордуковское. В результате было обнаружено доминирование МТБ, принадлежащих филуму *Nitrospirae*. На основании геномного анализа и анализа морфологии был предложен новый кандидатный род и вид филума *Nitrospirae* – '*Ca*. Magnetomonas plexicatena'. Впервые были идентифицированы МТБ семейства *Syntrophaceae*. Определена морфология бактерий новых обнаруженных филогенетических групп и доказана их принадлежность к МТБ. Разработанные в ходе работы метод MTB-CoSe и праймерная система на ген *mamK* могут использоваться для идентификации МТБ в сообществах с низкой численностью микроорганизмов. Предлагаемые методы могут быть использованы для выявления магнитотактических представителей филумов '*Latescibacteria'* и *Planctomycetes*, морфология магнетосом которых еще не определена.

Вследствие большой избирательности, метод магнитной сепарации в капилляре («race-track») позволил детально изучить некультивируемого пресноводного кокка UR-1. Получен его геном хорошего качества, на основе анализа которого было предложено отнести бактерию к новому виду-кандидату '*Ca*. Magnetaquicoccus inordinatus'. Впервые была ассоциирована морфология клеток и магнетосом пресноводного магнитотактического кокка с его генотипом. На основании филогенетического анализа последовательностей гена 16S рРНК, филогеномного анализа, расчета геномных индексов и анализа метаболизма было предложено выделить 5 семейств в порядке *Magnetococcales*. В семейство '*Ca*. Magnetaquicoccaceae' входит кокк UR-1. В геноме кокка UR-1 были идентифицированы гены формирования магнетосом. По результатам филогенетического анализа магнетосомных и коровых белков магнитатактических кокков впервые был показан горизонтальный перенос магнетосомных генов, хотя ранее предполагали их вертикальное наследование у МТБ порядка *Magnetococcales* (Morillo et al., 2014). В литературе имеются данные, что при применении одного и того же специфичного зонда выявлялись кокки с разным количеством цепочек магнетосом (Cox et al., 2002; Lin and Pan, 2009; Spring et al., 1995). Это позволило предположить отсутствие строгой корреляции между организацией магнетосом и филогенетическим положением магнитотактических кокков, и низкой таксономической значимости признака количества цепочек магнетосом в качестве фенотипического критерия для таксономии МТБ (Lin and Pan, 2009). Показанная нами возможность горизонтального переноса внутри порядка *Magnetococcales* может служить объяснением этому предположению.

В ходе наших исследований из р. Москва и оз. Белое Бордуковское были выделены в чистую культуру и описаны штаммы *Magnetospirillum moscoviense* BB-1$^{T}$ sp. nov. и *Magnetospirillum kuznetsovii* LBB-42 $^{T}$ sp. nov. Полученные чистые культуры могут быть использованы в качестве продуцентов магнетосом и для изучения процесса биоминерализации магнетита у МТБ.

Полученные результаты расширяют имеющиеся представления о разнообразии и биологии МТБ и вносят вклад в развитие современного понимания эволюции генов формирования магнетосом.

## ВЫВОДЫ

1. При исследовании разнообразия МТБ реки Уда и реки Москва с применением метода обогащения в капилляре было обнаружено доминирование магнитотактических кокков класса ‘*Ca.* Etaproteobacteria’. В микрокосме р. Москва также были найдены спириллы класса *Alphaproteobacteria*, которые были минорным компонентом. Выявленные магнитотактические кокки имели различную организацию магнетосомных цепей.
2. На основании данных высокопроизводительного секвенирования был реконструирован геном бактерии UR-1 из р. Уда. Выделено 5 семейств внутри порядка *Magnetococcales* и предложено отнести бактерию UR-1 к новому виду-кандидату ‘*Ca*. Magnetaquicoccus inordinatus’ семейства-кандидата ‘*Ca*. Magnetaquicoccaceae’. С помощью сравнительного геномного анализа впервые показано наличие горизонтального переноса магнетосомного геномного острова у представителей порядка *Magnetococcales*.
3. Разработан комплексный подход для изучения разнообразия МТБ, основанный на новом способе сепарации клеток МТБ и использовании праймерной системы на ген *mamK*. С помощью этого подхода показано доминирование МТБ, принадлежащих филуму *Nitrospirae* в микрокосме из оз. Белое Бордуковское. В качестве минорного компонента выявлены МТБ классов *‘Ca.* Etaproteobacteria’ и *Alphaproteobacteria*. Впервые идентифицирована МТБ, принадлежащая семейству *Syntrophaceae*. Методом FISH-ПЭМ анализа определена морфология клеток и магнетосом представителей филума *Nitrospirae* и семейства *Syntrophaceae*, и показана их принадлежность к магнитотактическим бактериям.
4. На основании данных высокопроизводительного секвенирования реконструирован геном бактерии LBB_01 из оз. Белое Бордуковское. Показано, что геномные характеристики отличают LBB_01 от ближайших представителей семейства-кандидата ‘*Ca. Magnetobacteraceae’* что позволяет отнести его к новому роду- и виду-кандидату ‘*Ca*. Magnetomonas plexicatena*’*.
5. На основании изучения физиологических и хемотаксономических признаков и филогеномного анализа новые штаммы МТБ, выделенные из р. Москва и оз. Белое Бордуковское, описаны и таксономически узаконены в качестве новых видов – *Magnetospirillum moscoviense* BB-1$^T$ sp. nov. и *Magnetospirillum kuznetsovii* LBB-42$^T$ sp. nov.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Экспериментальные статьи

1. Dziuba M, **Koziaeva V**, Grouzdev D, Burganskaya E, Baslerov R, Kolganova T, Chernyadyev A, Osipov G, Andrianova E, Gorlenko V, Kuznetsov B. *Magnetospirillum caucaseum* sp. nov., *Magnetospirillum marisnigri* sp. nov. and *Magnetospirillum moscoviense* sp. nov., freshwater magnetotactic bacteria isolated from three distinct geographical locations in European Russia // IJSEM. – 2016. - V. 66. - №5. – P. 2069-2077.

2. **Koziaeva V.V**., Dziuba M.V., Ivanov T.M., Grouzdev D.S., Kuznetsov B.B. Draft genome sequences of magnetotactic bacteria *Magnetospirillum moscoviense* BB-1 and *Magnetospirillum marisnigri* SP-1 // Genome announcements. – 2016. – V. 4(4). – pii: e00814-16.

3. **Козяева В.В**., Груздев Д.С., Дзюба М.В., Кузнецов Б.Б. Разнообразие магнитотактических бактерий реки Москва // Микробиология. - 2017. – Т. 86. - №1. - С. 99-106.

4. **Koziaeva V**., Rusakova S., Slobodova N., Uzun M., Kolganova T., Skryabin K.,. Grouzdev D. *Magnetospirillum kuznetsovii* sp. nov., a novel magnetotactic bacterium isolated from a lake in the Moscow region // IJSEM. - 2019. – V.69. – №. 7. – P. 1953-1959.

5. **Koziaeva V**., Dziuba M., Leão P., Uzun M., Krutkina M., Grouzdev D. Genome-based metabolic reconstruction of a novel uncultivated freshwater magnetotactic coccus '*Ca*. Magnetaquicoccus inordinatus' UR-1, and proposal of a candidate family '*Ca*. Magnetaquicoccaceae' // Frontiers in Microbiology. – 2019. – V.10. – P. 2290.

**Тезисы конференций**

1. **Козяева В.В.**, Груздев Д.С., Дзюба М.В.. Magnetospirillum sp. BB-1 – новый вид магнитотактических бактерий. IX молодежная школа-конференция с международным участием: Актуальные аспекты современной микробиологии. Москва, 21-23.10.2013 г. С. 13-15.

2. Dziuba M.V., **Koziaeva V.V**., Grouzdev D.S., Kuznetsov B.B. Taxonomic description of three novel freshwater magnetotactic spirillae isolated from distinct geographical points of Russia. 4th International Meeting on Magnetotactic Bacteria. Rio de Janeiro. 15-18.09.2014. P. 29.

3. **Козяева В.В**., Дзюба М. В. Выделение, описание и геномный анализ новых штаммов магнитотактических бактерий. XXVII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, 9-12.02.2015. С. 23.

4. **Koziaeva V.V.**, Grouzdev D.S., Dziuba M.V., Kuznetsov B.B.. Diversity of magnetotactic bacteria in freshwater sediments from distinct aquatic habitats. 5th International Meeting on Magnetotactic Bacteria. Marseille, 11-15.09.2016. P. 84.

5. **Козяева В.В.**, Дзюба М.В., Груздев Д.С., Кузнецов Б.Б. Молекулярная экология, таксономия и геномика пресноводных магнитотактических бактерий. XII Молодежная школа-конференция с международным участием. Актуальные аспекты современной микробиологии. Москва, 9-10.11.2017. С. 56-57.

6. Uzun M., **Koziaeva V.V.**, Sukhacheva M.V., Leão P., Patutina E.O., Alekseeva L.M., Kolganova T.V., Slobodova N.V., Grouzdev D.S. Novel approaches of magnetotactic bacteria investigation revealed new taxonomic groups. 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria. Kanazawa, 10-14.09.2018. P. 25

7. **Koziaeva V.**, Alekseeva L., Sukhacheva M., Uzun M., Leão P., Patutina E., Kolganova T., Slobodova N., Grouzdev D. Investigation of magnetotactic bacteria using novel approaches. FEMS2019. 8th Congress of European Microbiologists. Glasgow. 7-11. 07. 2019. – P.1266.

8. **Козяева В.В**., Дзюба М.В., Узун М.М., Алексеева Л.М., Груздев Д.С. Молекулярная экология, таксономия и геномика пресноводных магнитотактических бактерий. 2-й Российский микробиологический конгресс. Саранск. 23-27.09. 2019. – С. 44.