

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»

На правах рукописи

Козяева Вероника Валерьевна

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ, ТАКСОНОМИЯ И ГЕНОМИКА
МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

03.02.03 – Микробиология

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Груздев Д.С.

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность работы.	6
Цель и задачи исследования.	8
Научная новизна и значимость работы.	9
Практическая значимость.	9
Апробация работы.	9
Публикации	10
Объем и структура	10
Место проведения работы и благодарности.	10
ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
ГЛАВА 1. МАГНИТОТАКТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИИ КАК УНИКАЛЬНАЯ ГРУППА ПРОКАРИОТ.	12
1.1. Магнитотактические бактерии и магнитотаксис.	12
1.2. Экология МТБ.	14
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МТБ.	16
ГЛАВА 3. ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ.	19
ГЛАВА 4. ГЕНЫ БИОМИНЕРАЛИЗАЦИИ МАГНЕТОСОМ.	27
4.1. Организация магнетосомного геномного острова.	27
4.2. Процесс биоминерализации магнетосом.	29
4.3. Происхождение и эволюция генов биоминерализации магнетосом.	34
ГЛАВА 5. МЕТАБОЛИЗМ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВ <i>RHODOSPIRILLACEAE</i> И <i>MAGNETOCOCCACEAE</i>	37
ГЛАВА 6. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.	42
6.1. Используемые штаммы.	42
6.2. Материалы исследования.	42

6.3. Получение обогащенной фракции клеток МТБ.....	43
6.3.1. Сепарация МТБ методом магнитного обогащения в капилляре «gase-track».....	43
6.3.2. Сепарация МТБ методом магнитного обогащения в колонке МТВ-CoSe (Magnetotactic bacteria column separation).....	43
6.4. Микробиологические методы исследования.....	45
6.4.1. Составы питательных сред и условия культивирования.....	45
6.4.2. Изучение морфологии клеток.....	47
6.4.3. Выделение чистой культуры.....	48
6.4.4. Изучение физиологии штаммов.....	48
6.4.5. Анализ состава жирных кислот.....	50
6.5. Методы молекулярной биологии и биоинформатики.....	51
6.5.1. Выделение ДНК.....	51
6.5.2. Амплификация фрагментов исследуемых генов.....	52
6.5.3. Детектирование продуктов ПЦР.....	53
6.5.4. Очистка ПЦР-продуктов.....	53
6.5.5. Клонирование ПЦР-продуктов.....	53
6.5.6. Выделение плазмидной ДНК.....	54
6.5.7. Секвенирование ПЦР-фрагментов.....	54
6.5.8. Секвенирование и сборка геномной ДНК.....	55
6.5.9. Анализ полученных последовательностей.....	56
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	57
ГЛАВА 7. РАЗНООБРАЗИЕ МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ В РЕКЕ МОСКВА.....	57
7.1. Изучение морфологии клеток и магнетосом МТБ, выявленных в пробах из реки Москва.....	57
7.2. Филогенетический анализ МТБ.....	57
ГЛАВА 8. РАЗНООБРАЗИЕ МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ В ПРОБАХ ИЗ РЕКИ УДА.....	62

8.1. Получение обогащенной фракции МТБ из р. Уда и анализ их разнообразия.....	62
8.2. Детекция представителей ОТЕ UR-1 в сообществе реки Уда.	64
8.3. Данные о геноме кокка UR-1.	67
8.4. Выделение семейства-кандидата ' <i>Ca. Magnetaquicossaceae</i> ' в составе порядка <i>Magnetococcales</i>	69
8.5. Анализ генома штамма UR-1.....	77
8.5.1. Гены биоминерализации магнетосом.	77
8.5.2. Анализ метаболизма кокка UR-1.	85
8.5.2.1. Метаболизм азота.	85
8.5.2.2. Метаболизм серы.....	87
8.5.2.3. Метаболизм фосфора.	91
8.5.2.4. Метаболизм углерода.....	92
8.5.2.5. Жгутиковый аппарат и хемотаксис.	93
8.6. Характеристика новых предложенных таксонов-кандидатов.	95
ГЛАВА 9. РАЗНООБРАЗИЕ МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ ОЗЕРА БЕЛОЕ БОРДУКОВСКОЕ.....	96
9.1. Разработка специфичной праймерной системы для идентификации МТБ.....	96
9.2. Характеристика озера Белое Бордуковское и результаты магнитной сепарации клеток МТБ из микрокосма.	97
9.3. Анализ филогенетического разнообразия МТБ.....	98
9.3.1. Филогенетический анализ, проведенный на основе последовательностей белка MamK.	98
9.3.2. Филогенетический анализ, проведенный на основе последовательностей гена 16S рРНК.	100
9.4. Идентификация морфологии представителей новых групп МТБ.	102
9.5. Описание доминирующей ОТЕ LBB_01 в качестве нового вида-кандидата ' <i>Ca. Magnetomonas plexicatena</i> '.	103

9.5.1 Морфология бактерии LBB_01.....	103
9.5.2. Секвенирование и анализ генома бактерии LBB_01	105
9.5.3. Гены биоминерализации магнетосом	108
9.5.4. Описание нового вида-кандидата ‘ <i>Ca. Magnetomonas plexicatena</i> ’	110
ГЛАВА 10 ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПИСАНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР	
МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ.....	112
10.1. Выделение чистых культур МТБ.....	112
10.1.1. Выделение чистой культуры МТБ из реки Москва.	112
10.1.2. Выделение чистой культуры из озера Белое Бордуковское.	112
10.2. Морфология выделенных штаммов.....	113
10.3. Филогенетический анализ	114
10.4. Определение физиологических характеристик выделенных штаммов	115
10.5. Хемотаксономический анализ.	113
10.6. Секвенирование и анализ геномов штаммов BB-1 и LBB-42	118
10.7. Филогенетический анализ генов формирования магнетосом	119
10.8. Характеристика <i>Magnetospirillum moscoviense</i> sp. nov.	125
10.9. Характеристика <i>Magnetospirillum kuznetsovii</i> sp. nov.	126
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	127
ВЫВОДЫ.....	131
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	133
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	134
ПРИЛОЖЕНИЕ	162

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы.

Магнитотактические бактерии (МТБ) известны своей уникальной способностью синтезировать магнетосомы - внутриклеточные кристаллы магнетита или грейгита, окруженные мембраной. 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, Schuler, 2008). Более того, на поверхности мембраны, окружающей магнетосомы, можно иммобилизовать различные биологические молекулы.

Все это делает магнетосомы уникальными природными магнитными наночастицами, которые трудно воспроизвести химическими методами (Uebe, Schüler, 2016). Благодаря уникальности свойств, магнетосомы имеют высокий биотехнологический потенциал: от сепарации клеток и биологических молекул до диагностики и лечения заболеваний (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.

В последние годы развиваются исследования в области синтетической биологии с целью гетерологичной функциональной экспрессии генов биоминерализации магнетосом в легкокультивируемых немагнитотактических бактериях для стабильного получения биогенных магнитных наночастиц (Kolinko et al., 2014). Известно, что МТБ, в зависимости от таксономической принадлежности, синтезируют магнетосомы с разной формой и количеством кристаллов. Также видоспецифичным признаком является организация цепочек

магнетосом в клетке. 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 морфофизиологическое описание, обнаружены среди представителей классов *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, *'Eta*-, *Gammaproteobacteria* и филума *Nitrospirae*. Благодаря развитию технологий высокопроизводительного секвенирования и все большей их доступности, в базах данных появилось огромное количество метагеномных данных. Их анализ показывает наличие МТБ в составе филогенетических групп, которые ранее не были обнаружены при помощи стандартных подходов. Например, наличие таких генов было обнаружено у представителей филумов *'Latescibacteria'* и *Planctomycetes* (Lin, Pan, 2015; Lin, Pan, Bazyliniski, 2017). Это свидетельствует о том, что разнообразие МТБ намного шире, чем известно на данный момент.

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, Bazyliniski, 2013). Отсутствие референтных штаммов МТБ в различных таксономических группах также существенно затрудняет описание разнообразия МТБ на основе анализа 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, 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 *tamK*, который является одним из основных генов формирования магнетосом. Разработанная праймерная система позволяет идентифицировать МТБ разных таксономических групп. Предложен новый метод сепарации МТБ (МТВ-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 МТВ-CoSe с последующей амплификацией тотальной ДНК сообщества с применением разработанной праймерной системы, специфичной к функциональному гену *tamK*, 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).

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

ГЛАВА 1. МАГНИТОТАКТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИИ КАК УНИКАЛЬНАЯ ГРУППА ПРОКАРИОТ.

Первое упоминание о магнитотактических бактериях (МТБ) относится к 1963 г, когда они были обнаружены Сальватором Беллини в пресном водоеме недалеко от Павии (Италия). Он заметил бактерий, которые организованно двигались в направлении южного полюса магнита. Он дал им название «*Batteri magnetosensibili*» (магниточувствительные бактерии) и предположил, что такое поведение клеток связано с внутренним «магнитным компасом» клетки (Bellini, 1963). Ричард Блэкмор в 1974 г, независимо от Беллини, заново открыл МТБ и смог доказать наличие «магнитного компаса» - магнетосом - в их клетках (Blakemore, 1975). С момента открытия были идентифицированы различные по морфологии и филогенетическому положению МТБ в разнотипных водных экосистемах по всему миру, в том числе и в России (Lefèvre, Bazylnski, 2013). Например, в работах Сигалевича П.А. (Сигалевич, 1991; Сигалевич и Кузнецов, 1986), Чертова Н.В. (Чертов, 2000) и Дзюба М.В (Дзюба, 2013; Дзюба и др., 2013) были исследованы МТБ пресных водоемов европейской части России.

1.1. Магнитотактические бактерии и магнитотаксис.

К магнитотактическим бактериям относят разнообразных по морфологии, физиологии и филогении бактерий, которых объединяет способность синтезировать внутриклеточные органеллы – магнетосомы (Bazylnski, Frankel, 2004). Магнетосомы состоят из кристалла магнитного материала – магнетита (Fe_3O_4) или грейгита (Fe_3S_4) - и мембраны, состоящей преимущественно из фосфолипидов и уникальных белков, не представленных в цитоплазме и внешней мембране бактерии (Gorby, Beveridge, Blakemore, 1988; Grünberg et al., 2004). Размеры зрелых кристаллов магнетосом находятся в пределах 35-120 нм (Bazylnski, Frankel, 2004). Внутри этого диапазона размеров в кристалле формируется постоянный единичный магнитный домен, в результате чего кристаллы магнетосом имеют максимально возможный магнитный момент на

единицу объема. Кристаллы меньших размеров (<35 нм) являются суперпарамагнитными, то есть они не постоянно намагничены. В кристаллах же больших размеров (>120 нм) формируются множественные магнитные домены (Butler, Banerjee, 1975; Diaz Ricci, Kirschvink, 1992). Внутри клетки магнетосомы обычно организованы в цепочки, что придает клетке постоянный магнитный дипольный момент. Цепочка магнетосом действует как стрелка компаса, которая выравнивается вдоль линий геомагнитного поля. Таким образом, с помощью магнетосом клетка пассивно ориентируется вдоль вертикальной составляющей внешнего магнитного поля Земли (Рис. 1). Движение клетки вдоль линий магнитного поля осуществляется жгутиками. Пассивную ориентацию вместе с направленным движением с помощью жгутиков называют магнитотаксисом (Blakemore, 1975).

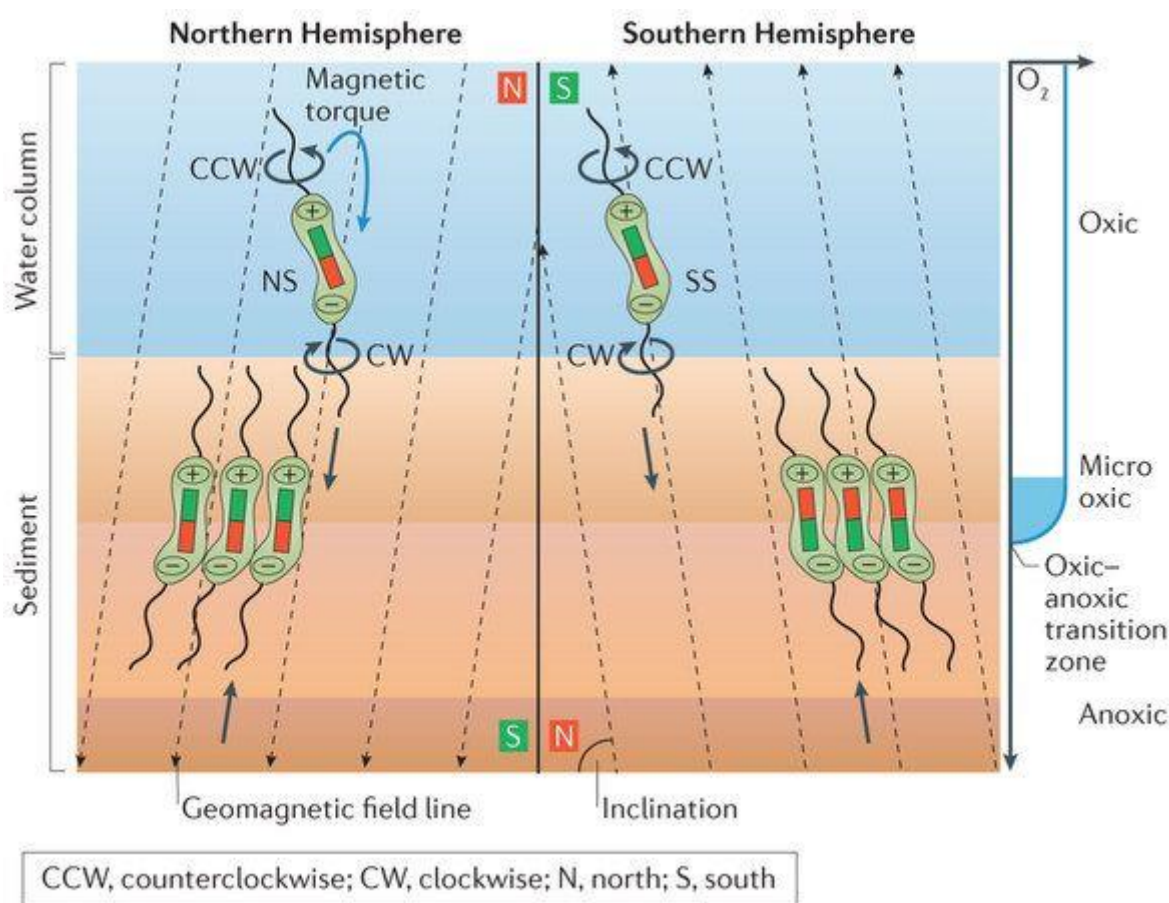


Рисунок 1. Модель магнитотаксиса. Цитировано по (Uebe, Schüler, 2016)

В настоящее время существует одна наиболее принятая гипотеза относительно функций магнетосом. Было предположено, что благодаря им повышается эффективность поиска бактериями наиболее предпочтительных условий роста с низким содержанием кислорода. Считается, что с помощью магнитотаксиса клетка находит оптимальную для роста зону в химически стратифицированных водных биотопах (Frankel et al., 1997). Магнитоаэротаксис – наиболее точное название этого типа движения клетки, поскольку магнетосомы пассивно ориентируют бактерий вдоль линий магнитного поля, а аэротактические сигналы побуждают клетку передвигаться в зоны с пониженным окислительно-восстановительным потенциалом. Магнитотаксис, вероятно, повышает эффективность аэротаксиса в вертикальном градиенте концентрации кислорода, так как сокращает выбор из трех направлений движения до одного (Frankel et al., 1997).

Было предположено, что механизм восприятия магнитного поля магнитотактическими бактериями намного сложнее, чем простое ориентирование по линиям магнитного поля. Было показано, что штамм '*Magnetospirillum magneticum*' AMB-1 может воспринимать не только направление, но также и градиенты магнитных полей (González et al., 2014). Было предположено, что такая чувствительность обеспечивает защиту клеток AMB-1 от собственного магнетизма в условиях магнитных флуктуаций в среде обитания. Например, если МТБ находится вблизи большого объема магнетита, она может быть иммобилизована на нем из-за наличия внутри нее магнетосом. Такие накопления магнетита могут образовываться при отмирании МТБ, что приводит к увеличению объема магнитного материала в осадках и, следовательно, увеличению магнитного поля, исходящего от этих частиц (Peterson, Dobeneck von, Vali, 1986; Stolz, Chang, Kirschvink, 1986).

1.2. Экология МТБ.

МТБ были обнаружены на всех континентах как в придонных осадках, так и в стратифицированных водных колонках пресноводных, солоноватых,

морских и гиперсоленых мест обитания (Bazyliniski, Frankel, 2004). Многие МТБ были найдены в озерах (Simmons, Bazyliniski, Edwards, 2007), реках (Дзюба и др., 2013), морях (Petermann, Bleil, 1993; Wenter et al., 2009), приливных зонах (Pan et al., 2008), термальных источниках ($<63^{\circ}\text{C}$) (Lefèvre et al., 2010), антарктическом побережье (Abreu et al., 2012), сильнощелочных озерах ($\text{pH}\sim 9.5$) (Lefèvre et al., 2011a), гиперсоленых лагунах (Sobrinho, Lins, Bernardes, 2011). Кроме того, МТБ были обнаружены в соленых маршах (Bazyliniski et al., 2013a), влажных почвах (Fassbinder, Stanjek, Vali, 1990) и рудных месторождениях (Yanli et al., 2006).

Присутствие МТБ не зависит от высоких концентраций железа. МТБ требуют присутствия зоны окислительно-восстановительного перехода (ОВП), представляющую собой противоположные градиенты кислорода и восстановленных соединений (как правило, сульфида) в осадках (Frankel et al., 1997a). Наибольшее количество МТБ обычно находится на уровне или чуть ниже ОВП (Moskowitz et al., 2008). Более того, в самой зоне ОВП разные виды МТБ занимают разные ниши, скорее всего из-за различий химических условий в зависимости от глубины. Магнетит-продуцирующие МТБ, находятся непосредственно в зоне ОВП, в то время как продуцирующие грейгит бактерии присутствуют ниже ОВП, в сульфидной бескислородной зоне (Lefèvre et al., 2011b; Moskowitz et al., 2008). Глубина, на которой были обнаружены МТБ, составляет от одного до 3000 м. Недавно был обнаружен интересный способ существования МТБ, у которых отсутствуют жгутики, в симбиозе с протистами (Monteil et al., 2019).

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МТБ.

До недавнего времени изучение МТБ проводили с помощью микроскопических методов и выделения чистых культур. Были выделены чистые культуры магнитотактических спирилл рода *Magnetospirillum*: *Ms. magnetotacticum* MS-1^T (Blakemore, Maratea, Wolfe, 1979), '*Ms. magneticum*' AMB-1 (Matsunaga, Sakaguchi, Tadakoro, 1991), *Ms. gryphiswaldense* MSR-1^T (Schleifer et al., 1991), магнитотактического кокка *Magnetococcus marinus* MC-1^T (Meldrum et al., 1993) и *Desulfovibrio magneticus* RS-1^T (Sakaguchi, Burgess, Matsunaga, 1993). Развитие молекулярных методов, в особенности определения нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, привело к открытию МТБ, принадлежащих не только филуму *Proteobacteria*. Например, была идентифицирована крупная магнитотактическая палочка '*Ca. Magnetobacterium bavaricum*', принадлежащая филуму *Nitrospirae* (Flies, Peplies, Schüler, 2005; Spring et al., 1993). После этого было обнаружено большое количество МТБ, демонстрирующих их высокое морфологическое и филогенетическое разнообразие (Lefèvre, Bazyliniski, 2013).

На настоящий момент в чистую культуру выделено около 25 видов МТБ, больше половины из которых относятся к роду *Magnetospirillum* класса *Alphaproteobacteria*. Для культивирования МТБ не существует селективной среды, поскольку все они разные по своей физиологии. Только для *Magnetospirillum* были разработаны среды DSM 380 (DSMZ medium № 380), MSGM (magnetic spirillum growth media) и ACAM (activated charcoal agar medium) на которых успешно проводят получение чистых культур магнитотактических спирилл (Schleifer et al., 1991; Schultheiss, Schüler, 2003; Wang et al., 2015b; Woehl et al., 2014).

В отличие от других некультивируемых бактерий, МТБ из природных образцов можно собрать, используя их способность к магнитотаксису (Wolfe, Thauer, Pfennig, 1987a). Для этого ставят магнит у края микрокосма и собирают образовавшееся светло-серое пятно биомассы МТБ. Техники обогащения клеток МТБ такие, как методы магнитной сепарации в капилляре «race-track»

(Wolfe, Thauer, Pfennig, 1987a) и «MTB-trap» (Jogler et al., 2009a), применяются для вторичной очистки клеток МТБ от немагнитотактических клеток. Существуют исследования, при которых оценивалось разнообразие до магнитной сепарации в капилляре «race-track» и после нее. Было показано, что разнообразие МТБ до применения вторичной сепарации было намного шире, что говорит о несовершенстве этого метода (Lin et al., 2008). То же самое можно сказать и о первичной сепарации МТБ из источника, при которой с большей вероятностью отбираются наиболее мобильные и наиболее толерантные к кислороду представители (Lefèvre, Bazyliniski, 2013).

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) широко распространена для определения филогенетической принадлежности одиночных клеток. Этот подход широко применяется и для изучения МТБ. С его помощью были идентифицированы, например, «мультиклеточные» МТБ (Martins et al., 2012; Wenter et al., 2009; Zhou et al., 2012), штамм LO-1 (Lefevre et al., 2011c), множество магнитотактических кокков (Abreu et al., 2012; Lin, Pan, 2009; Spring et al., 1992; Spring et al., 1995; Spring et al., 1998; Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2012).

Совместив вместе флуоресцентную гибридизацию и электронную микроскопию, так называемый метод FISH-ПЭМ, Li с соавт. идентифицировали новую бактерию SHNR-1 класса *Gammaproteobacteria* и доказали наличие магнетосом в клетке (Li et al., 2017a). Затем данный метод был успешно применен для идентификации морского магнитотактического кокка класса ‘*Ca. Etaproteobacteria*’ SHNC-1 (Zhang et al., 2017) и МТБ класса *Deltaproteobacteria* WYHR-1 (Li et al., 2019). Морфология магнетосом, структура и состав их кристаллов были детально изучены с помощью просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения (ПЭМ ВР) (Pósfai et al., 2013).

В настоящее время применение методов высокопроизводительного секвенирования позволило определить геномы некультивируемых МТБ, главным образом с помощью двух методов, которые включают метод секвенирования одиночной клетки (single-cell) и метагеномный анализ. В

частности, с помощью секвенирования одиночной клетки была идентифицирована новая овоидная магнитотактическая бактерия SKK-01, принадлежащая филуму-кандидату '*Omnitrophica*', а также девять представителей филумов *Proteobacteria* и *Nitrospirae* (Kolinko et al., 2012; Kolinko et al., 2013). Из метагеномных данных был реконструирован геном '*Ca. Magnetominusculus xianensis*' HCH-1 (Lin et al., 2017). Путем анализа открытых баз данных геномов, были идентифицированы представители филумов '*Latescibacteria*' и *Planctomycetes*, что привело к предположению, что разнообразие бактерий, обладающих способностью синтезировать магнетосомы, может быть намного шире, чем считалось ранее (Lin, Pan, Bazyliński, 2017).

ГЛАВА 3. ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ.

Морфологическое разнообразие МТБ было выявлено еще до использования молекулярных методов. В природных образцах воды и придонных осадков исследователи обнаруживали различные, иногда уникальные морфотипы МТБ (Рис. 2). Наиболее часто встречаемые морфотипы клеток - кокки, овоидные клетки, палочки, вибрионы и спирали различных размеров. Двумя уникальными морфотипами являются группа «мультиклеточных» бактерий и крупная палочка '*Ca. Magnetobacterium bavaricum*' (Lefèvre, Bazylinski, 2013). Практически все культивируемые и некультивируемые МТБ подвижны с помощью жгутиков (Jogler et al., 2011; Lefèvre, Bazylinski, 2013). Расположение жгутиков отличается среди видов МТБ и может быть полярным, биполярным и в виде пучков.

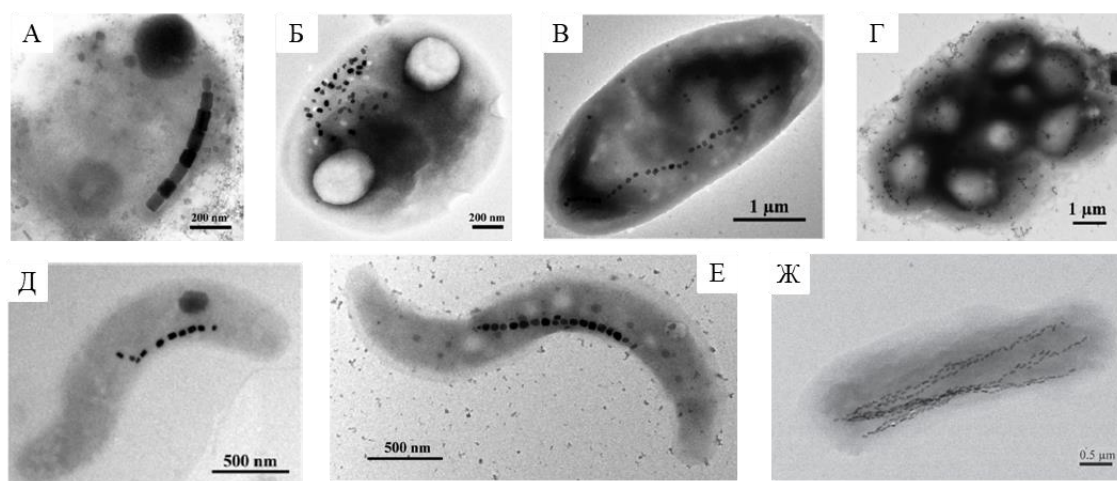


Рисунок 2. Морфотипы МТБ. А, Б) кокки; В, Ж) палочка; Г) «мультиклеточная» МТБ; Д) вибрион; Е) спирали. Цитировано по (Lefèvre, Bazylinski, 2013)

Другим признаком, который показывает значительное разнообразие, является форма и размер кристаллов, а также расположение магнетосом внутри клетки (Рис. 3). Обычно размер магнетосом составляет 35-120 нм (Devouard et al., 1998). В большинстве МТБ магнетосомы организованы в одну или несколько цепей, параллельных длинной оси клетки. Также магнетосомы могут находиться в виде множественных «пучков» (в основном у *Nitrospirae*) и в виде

кластеров, расположенных, как правило, на одной стороне клетки (у магнитотактических кокков) (Cox et al., 2002).

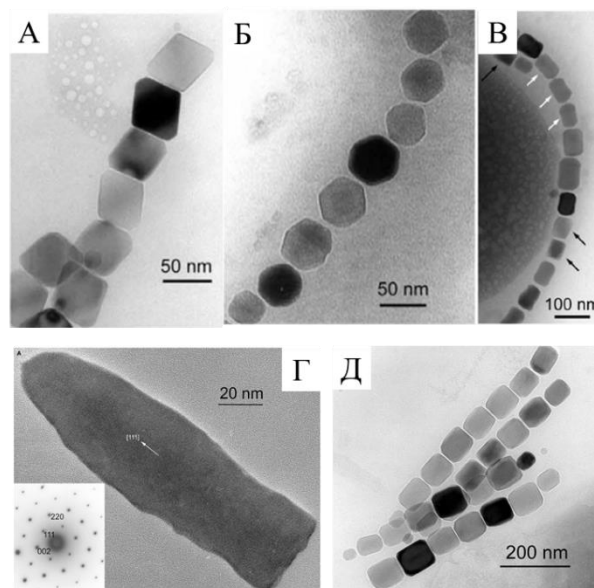


Рисунок 3. Морфология кристаллов магнетосом. А) октаэдрические; Б) кубооктаэдрические; В) удлиненные октаэдрические; Г) удлиненные анизотропные («пулевидные»); Д) удлиненные призматические. Цитировано по (Pósfai et al., 2013)

Кроме магнетосом внутри клеток бывают крупные включения, содержащие элементарную серу, полифосфаты, полигидроксibuтират (ПГБ) (Cox et al., 2002; Freitas et al., 2003; Moench, Konetzka, 1978; Moench, 1988). Исследование МТБ из реки Сена показало, что клетки некоторых некультивируемых МТБ содержат включения Ва и СаО (Isambert et al., 2007). Клетки ‘*Ca. Magnetovum mohavensis*’ содержат многочисленные серные глобулы и другие более мелкие включения неизвестного состава, которые имеют электронно-плотную периферию с менее плотным центром (Lefevre et al., 2011c). В некоторых случаях клеточные включения легко наблюдаются с использованием световой микроскопии из-за их высокой преломляющей способности (например, глобулы серы) и обеспечивают четкое указание на физиологию бактерии (например, окисление сульфида).

МТБ являются полифилетической группой, но все известные МТБ принадлежат царству *Bacteria* (Рис. 4) (Lin, Li, Pan, 2011).

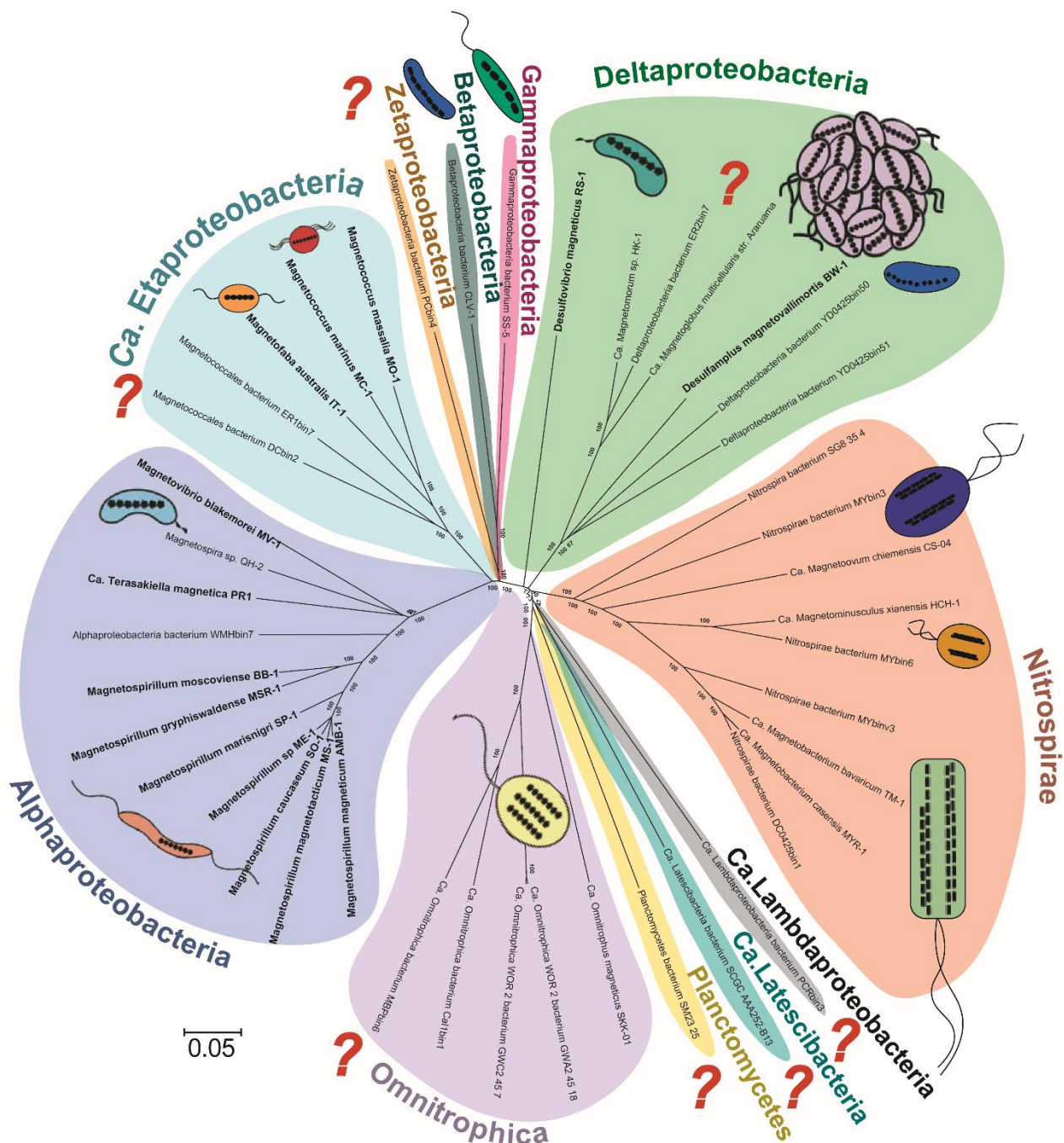


Рисунок 4. Филогенетическое разнообразие МТБ. Жирным шрифтом выделены культивируемые МТБ. Красным знаком вопроса обозначены филогенетические группы МТБ, для представителей которых не определена морфология. (Рисунок автора).

До сих пор не было обнаружено ни одного магнитотактического организма, филогенетически связанного с археями. Представители МТБ были обнаружены в различных филогенетических группах, включая классы *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, ‘*Ca. Etaproteobacteria*’, филумы *Nitrospirae* и

Planctomycetes, а также филумы-кандидаты '*Latescibacteria*' и '*Omnitrophica*' (Lefèvre, Bazylnski, 2013; Lin, Pan, 2015; Lin, Pan, Bazylnski, 2017).

Магнитотактические бактерии класса *Alphaproteobacteria* представлены порядками *Rhodospirillales* и *Rhizobiales*. К первым относятся морские и пресноводные спираиллы родов *Magnetospirillum* и *Magnetospira* (*Magnetospira thiophila* MMS-1 и *Magnetospira* sp. QH-2), а также вибрионы рода *Magnetovibrio*: *Magnetovibrio blakemorei* MV-1^T и MV-2 (Bazylnski et al., 2013a; Bazylnski et al., 2013b; Lefèvre et al., 2009; Williams et al., 2012; Zhu et al., 2010). К МТБ порядка *Rhizobiales* относится выделенная в чистую культуру бактерия '*Candidatus Terasakiella magnetica*', отнесенная к семейству *Methylocystaceae* (Monteil et al., 2018). Стоит отметить, что род *Magnetospirillum* также включает бактерии, сходные с магнитотактическими по морфологии и филогении, но не способных к образованию магнетосом. К ним относится филогенетически близкий к *Ms. gryphiswaldense* штамм J10, а также штаммы *Ms. bellicus* и *Ms. aberrantis*, не обладающие способностью к магнитотаксису (Geelhoed et al., 2009; Thrash et al., 2010; Горленко и др., 2011).

Магнитотактические кокки, принадлежащие порядку *Magnetococcales*, являются наиболее часто встречаемым морфотипом, по сравнению с другими МТБ, как в пресных (Flies et al., 2005; Flies, Peplies, Schüller, 2005; Lin, Pan, 2009; Lin, Pan, 2010; Moench, Konetzka, 1978; Spring et al., 1995), так и в морских средах обитания (Abreu et al., 2012; Du et al., 2017; Spring et al., 1998; Zhang et al., 2012). Но, несмотря на это, в чистую культуру удалось выделить только пять морских представителей – *Magnetococcus marinus* MC-1^T (Frankel et al., 1997a), *Magnetofaba australis* IT-1 (Morillo et al., 2014), '*Ca. Magnetococcus massalia*' MO-1 (Lefèvre et al., 2009) и штаммы PR-3 и SS-1 (Lefèvre et al., 2014). При изучении магнитотактических кокков их ранее определяли как представителей класса *Alphaproteobacteria* (Amann, Peplies, Schüller, 2006). Однако, с получением геномов трех культивируемых кокков и их анализа, было предложено отнести их к отдельному классу ('*Candidatus Etaproteobacteria*'), поскольку детальный анализ не выявил их принадлежность ни к одному из

известных классов *Proteobacteria* (Ji et al., 2017). Недавно, благодаря метагеномному подходу, были реконструированы 12 геномов пресноводных магнитотактических кокков из метагеномных данных. Результаты их сравнительного геномного анализа подтвердили, что порядок *Magnetococcales* принадлежит новому классу, а не находится в составе класса *Alphaproteobacteria* (Lin et al., 2018). Хотя к порядку *Magnetococcales* по результатам многочисленных исследований относятся МТБ кокковидной формы, с помощью технологии амплифицирования генома одной клетки была обнаружена магнитотактическая палочка, которая также принадлежит к этому порядку (Kolinko et al., 2013). МТБ порядка *Magnetococcales* синтезируют магнетосомы удлиненной призматической и удлиненной октаэдрической формы (Pósfai et al., 2013); однако, для штамма SHNC-1 была показана широкая вариативность форм кристаллов внутри одной и той же клетки (Zhang et al., 2017). Расположение магнетосом внутри клеток различно: они организованы в одну, две или более цепочек, также обнаружены клетки, у которых магнетосомы не организованы в цепочки и расположены у одного края клетки в виде кластера (Abreu et al., 2012; Du et al., 2017; Lefèvre et al., 2009; Lin, Pan, 2009; Morillo et al., 2014; Pan et al., 2008; Zhang et al., 2012). По своей филогении представители порядка *Magnetococcales* также разнообразны, как и по своей морфологии. Предпринимались попытки связать морфологию клетки с ее последовательностью 16S рРНК с помощью методов FISH и FISH-ПЭМ, однако, точные результаты для пресноводных кокков не были достигнуты (Lin, Pan, 2009; Spring et al., 1995). Только для морских кокков было проведено ассоциирование морфологии клеток и магнетосом с их филогенетическим положением (Abreu et al., 2012; Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2012). Однако, для этих кокков известна только последовательность их 16S рРНК. Для пресноводных магнитотактических кокков, у которых расшифрованы геномы, не были проведены исследования их морфологии (Lin et al., 2018).

Известные представители магнитотактических *Deltaproteobacteria* принадлежат двум порядкам: *Desulfovibrionales* (рода *Desulfovibrio* и

Desulfonatronum) и *Desulfobacterales* (рода ‘*Ca. Magnetoglobus*’, ‘*Ca. Magnetananas*’, ‘*Ca. Magnetomorum*’ и *Desulfamplus*). МТБ этого класса синтезируют как магнетит-, так и грейгит-содержащие магнетосомы. *Desulfovibrio magneticus* RS-1^T – первая культивируемая МТБ класса *Deltaproteobacteria*, имеет форму палочки и синтезирует искривленные пулевидные кристаллы магнетита. К этому классу также относятся крупные палочки, формирующие оба типа кристаллов магнетосом (*Desulfamplus magnetovallimortis* BW-1^T и штамм SS-2) (Descamps et al., 2017) и магнетит-продуцирующие вибрионы, выделенные из щелочных мест обитания в Калифорнии (Lefèvre et al., 2011a; Lefèvre et al., 2011b; Sakaguchi, Arakaki, Matsunaga, 2002).

Одним из самых необычных морфологических типов МТБ, формирующих кристаллы грейгита, являются «мультиклеточные» магнитотактические прокариоты (ММП) класса *Deltaproteobacteria*. На основании последних данных акроним «мультиклеточный» используют для этого типа МТБ, поскольку доказано, что индивидуальные клетки взаимодействуют друг с другом и согласованно осуществляют процессы образования магнетосом и магнитотаксиса. ММП – агрегация нескольких граммотрицательных, генетически схожих клеток, которые передвигаются в агрегированном виде. Клетки, отделившиеся от агрегата, быстро погибают. К представителям этого типа МТБ относятся, например, ‘*Ca. Magnetoglobus multicellularis*’, ‘*Ca. Magnetomorum litorale*’, и ‘*Ca. Magnetananas tsingtaoensis*’ (Abreu et al., 2007; Wenter et al., 2009; Zhou et al., 2012). Выявлены 2 типа ММП: сфероидной (‘*Ca. Magnetomorum tsingtaoreseum*’ и ‘*Ca. Magnetomorum rongchengrosum*’) и эллипсоидной (‘*Ca. Magnetananas drummondensis*’, ‘*Ca. Magnetananas rongchenensis*’ и ‘*Ca. Magnetananas tsingtaoensis*’) формы. Сфероидные ММП обычно 3-12 мкм в диаметре и состоят из 10-40 клеток со спиральной симметрией. Эллипсоидные ММП имеют размеры 8-23 мкм в длину и 7-17 мкм в ширину, состоят из 28-100 клеток, организованных в виде перекрещивающихся колец (Chen et al., 2016).

Имеется сравнительно мало информации об МТБ класса *Gammaproteobacteria*. Известны только два культивируемых представителя: BW-2 и SS-5, а также некультивируемый штамм SHNR-1. Штамм BW-2 принадлежит порядку *Thiotrichales*, в то время как штаммы SS-5 и SHNR-1 - к порядку *Chromatiales* (Lefèvre et al., 2012a; Li et al., 2017a).

Был идентифицирован единственный представитель класса *Betaproteobacteria*, принадлежащий роду *Herbaspirillum*. Он имел вибриоидную форму и синтезировал одну цепочку удлиненных призматических магнетосом. Он был обнаружен в пресной лагуне Бразилии, имеющей pH 4.4 (Abreu et al., 2018).

Среди филума *Nitrospirae* нет культивируемых МТБ. Несколько некультивируемых представителей этой группы МТБ были детально описаны. Большинство представителей принадлежат семейству-кандидату 'Ca. Magnetobacteraceae'. В составе этого семейства находятся несколько родов-кандидатов: 'Ca. Magnetobacterium', 'Ca. Magnetoovum' и 'Ca. Magnetominusculus'. Представители этих родов имеют разную морфологию клеток и организацию магнетосом. 'Ca. Magnetobacterium bavaricum', 'Ca. Mb. casensis' и бактерия из озера Миюн (Китай), 'Ca. Mb. bavaricum' имеют форму палочки и синтезируют множественные цепочки магнетосом. Штаммы 'Ca. Magnetoovum chiemensis' CS-04 и 'Ca. Mo. mohavensis' LO-1 имеют форму крупных овоидов и синтезируют 100–200 магнетосом (Lefèvre, Bazyliński, 2013). Для бактерий рода 'Ca. Magnetominusculus', 'Ca. Mm. xianensis' HCH-1 морфология не была определена (Lin et al., 2017), но по последовательности гена 16S рНК она имела 100% сходства с геном *Nitrospirae bacterium* MY3-11A, для которой была показана овоидная форма меньшего, чем у LO-1, размера (Lin et al., 2011). Большинство МТБ филума *Nitrospirae* были найдены в мезофильных пресноводных экосистемах, за исключением штаммов WGC и BGC (Qian et al., 2019), и нескольких ОТЕ, найденных в придонных осадках Желтого моря (Китай) (Xu et al., 2018). Кроме этого, был обнаружен и описан термофильный штамм 'Ca. Thermomagnetovibrio paiutensis' HSMV-1. Он

является филогенетически близким к культивируемым штаммам *Thermodesulfovibrio* spp. Клетки штамма HSMV-1 имеют форму вибрионов и синтезируют одну цепочку магнетосом (Lefèvre, Bazyliniski, 2013). Все МТБ филума *Nitrospirae* формируют «пулевидные» магнетосомы.

К филуму-кандидату '*Omnitrophica*' относят овоидную бактерию '*Ca. Omnitrophus magneticus*' SKK-01, которая синтезирует пулевидные магнетосомы (Kolinko et al., 2012). Кроме нее в метагеномных данных были реконструированы 4 генома из метагеномных данных (Lin et al., 2018).

В базе метагеномных данных NCBI был обнаружен представитель филума-кандидата '*Ca. Latescibacteria*', в геноме которого был идентифицирован кластер генов, кодирующих белки биоминерализации магнетосом (Lin, Pan, 2015). Затем, при анализе общедоступных метагеномных баз данных GenBank и IMGer, были идентифицированы 6 новых кластеров генов биоминерализации магнетосом. Один из этих обнаруженных геномов был аффилирован с филумом *Planctomycetes* (Lin, Pan, Bazyliniski, 2017). Также метагеномный подход к исследованию МТБ привел к открытию магнитотактических представителей, принадлежащих классам *Lambda*- и *Zetaproteobacteria* (Lin et al., 2018). Эти последние открытия указывают на то, что разнообразие МТБ значительно шире и может распространяться и на другие филогенетические группы, в которых в настоящее время МТБ не обнаружены.

ГЛАВА 4. ГЕНЫ БИОМИНЕРАЛИЗАЦИИ МАГНЕТОСОМ.

4.1. Организация магнетосомного геномного острова.

Первая информация о генах, связанных с синтезом магнетосом была получена в начале двухтысячных годов, когда была расшифрована последовательность геномной ДНК *Ms. gryphiswaldense* MSR-1^T (Grünberg et al., 2001). МТБ-специфичные гены были идентифицированы и обозначены как *tam* (magnetosome membrane) и *mms* (magnetic particle membrane-specific) гены. Позднее схожие гены были найдены в геномах других магнитотактических штаммах класса *Alphaproteobacteria* – ‘*Ms. magneticum*’, *Mv. blakemorei*, *Ms. marinus* и *Magnetospira* sp. QH2 (Ji et al., 2014; Jogler et al., 2009b; Matsunaga et al., 2005; Schübbe et al., 2009). Гены *tam* также присутствуют в геномах магнитотактических *Deltaproteobacteria*: *D. magneticus* RS-1^T, ‘*Ca. Magnetoglobus multicellularis*’, *Desulfamplus magnetovallimortis* BW-1^T и у алкалофильного штамма ML-1. Также схожие гены были найдены у штамма SS-5, представителя класса *Gammaproteobacteria* и некультивируемого ‘*Ca. Magnetobacterium bavaricum*’, представителя филума *Nitrospirae* (Abreu et al., 2011; Jogler et al., 2011; Lefèvre et al., 2011b; Lefèvre et al., 2013a; Nakazawa et al., 2009).

В геномах всех МТБ магнетосомные гены находятся в виде близкорасположенных друг к другу кластеров. У *Magnetospirillum* внутри острова обнаружены 4 основных оперона: *tamAB*, *tamGFDC*, *tamXY* и *mms6* и дополнительный оперон, содержащий гены *feoAB1*. Только оперон *tamAB* присутствует у всех МТБ (Uebe, Schüler, 2016). Исследования функций генов формирования магнетосом с помощью анализа делеционных мутантов ‘*Ms. magneticum*’ и *Ms. gryphiswaldense* показали, что только *tamAB* оперон содержит гены, без которых синтез магнетосом не возможен. Другие опероны или гены, в зависимости от филогенетического положения бактерии или типа магнетосом, имеют функции контроля размера и морфологии кристалла. *MamGFDC* и *mms* опероны являются на данный момент специфичными для

магнитотактических *Alphaproteobacteria*, в то время как у магнитотактических *Deltaproteobacteria* и *Nitrospirae* найдены специфичные *mad* (magnetosome-associated deltaproteobacterial) и *man* (magnetosome-associated nitrospirae) гены (Lin et al., 2014). Строение МГО у МТБ различных таксономических групп изображено на рисунке 5.

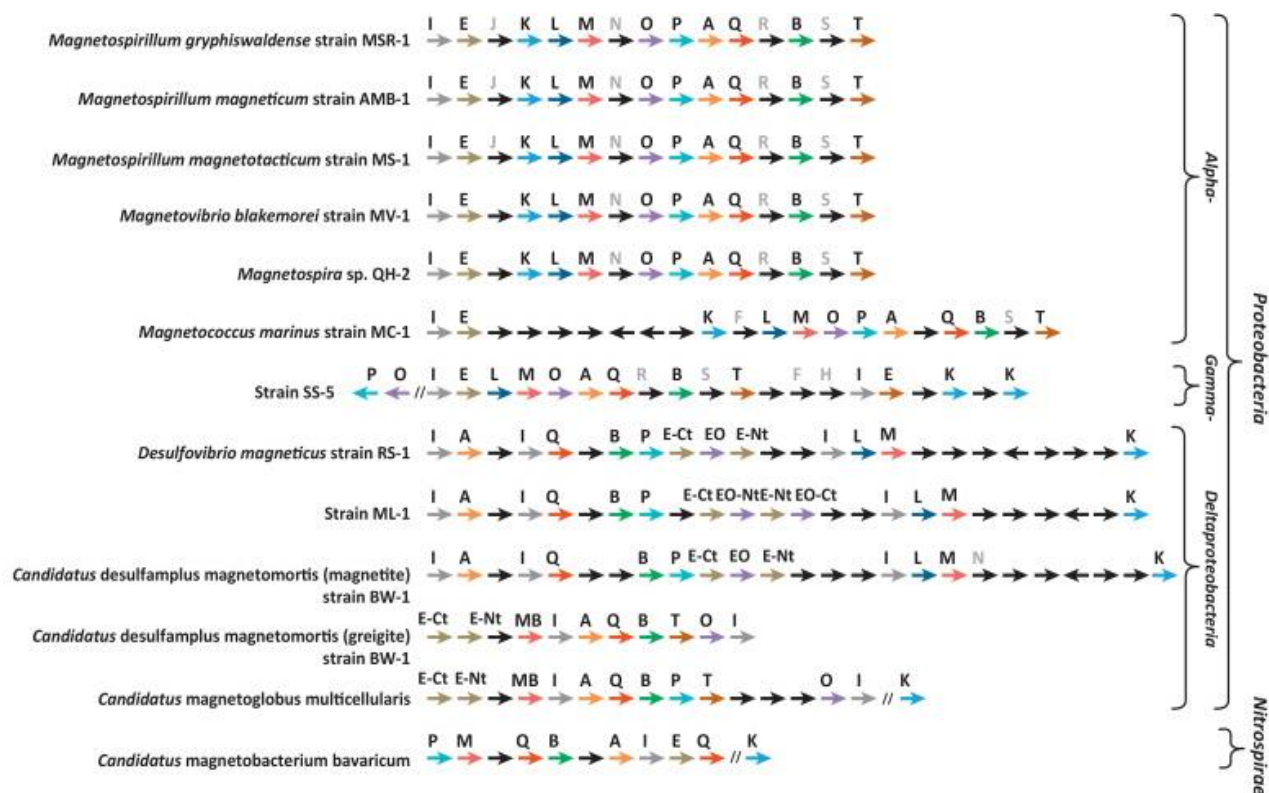


Рисунок 5. Схематичное изображение *tamAB* оперона в магнетосомном геномном острове. Цветом показаны общие для всех МТБ гены, черным – специфичные для конкретной группы МТБ. Цитировано по (Lefèvre, Wu, 2013)

Минимальный набор генов, требуемых для формирования магнетосом, находится в *tamAB* опероне, который состоит из 10 генов (*tamABEIKLMOPQ*) у бактерий, продуцирующих магнетит. У грейгит-формирующих бактерий обнаружены 9 общих генов (*tamABEIKMOPQ*) в составе этого оперона (Lefèvre et al., 2013a). Гены *mad*, *man* и *tms*, предположительно, контролируют формирование определенной морфологии кристаллов магнетосом. Например, гены *mad* и *man* специфичны для видов, у которых формируются удлиненные магнитные частицы «зубовидной» или «пулевидной» формы, а гены *tms* для видов с кубооктаэдрическими и призматическими магнетосомами (Lefèvre, Wu, 2013). Недавние исследования МГО *Desulfovibrio magneticus* RS-1^T

подтвердили, что мутации в *mad* генах приводят к дефектам в строении кристаллов (Rahn-Lee et al., 2015).

Участок генома, содержащий кластеры магнетосомных генов, имеет признаки геномных островов. Например, по сравнению с остальной частью генома, он имеет другой G+C состав и содержит гены тРНК, псевдогены, транспозоны и инсерционные элементы (Dobrindt et al., 2004; Richter et al., 2007). МГО '*Ms. magneticum*' AMB-1 имеет размер около 98 т.п.о., ограничен двумя прямыми повторами размером 1.1 т.п.о. и кодирует приблизительно 100 белков, что составляет более 2% генетического материала бактерии (Fukuda et al., 2006). МГО *Ms. gryphiswaldense* MSR-1^T, имеет размер около 130 т.п.о., и не имеет четких границ (Ullrich et al., 2005).

4.2. Процесс биоминерализации магнетосом.

О процессе биоминерализации грейгитовых магнетосом известно мало. Процесс синтеза магнетитовых магнетосом, наоборот, хорошо изучен. Вся информация о синтезе магнетита основана на изучении двух представителей рода *Magnetospirillum*: *Ms. gryphiswaldense* MSR-1^T и '*Ms. magneticum*' AMB-1, которые синтезируют кубооктаэдрические магнетосомы. Эти микроорганизмы относительно легко культивируются и существуют последовательно их полных геномов. Биоминерализация магнетосом – сложный процесс, состоящий из нескольких этапов. Схематичная модель процесса формирования магнетосом представлена на рисунке 6.

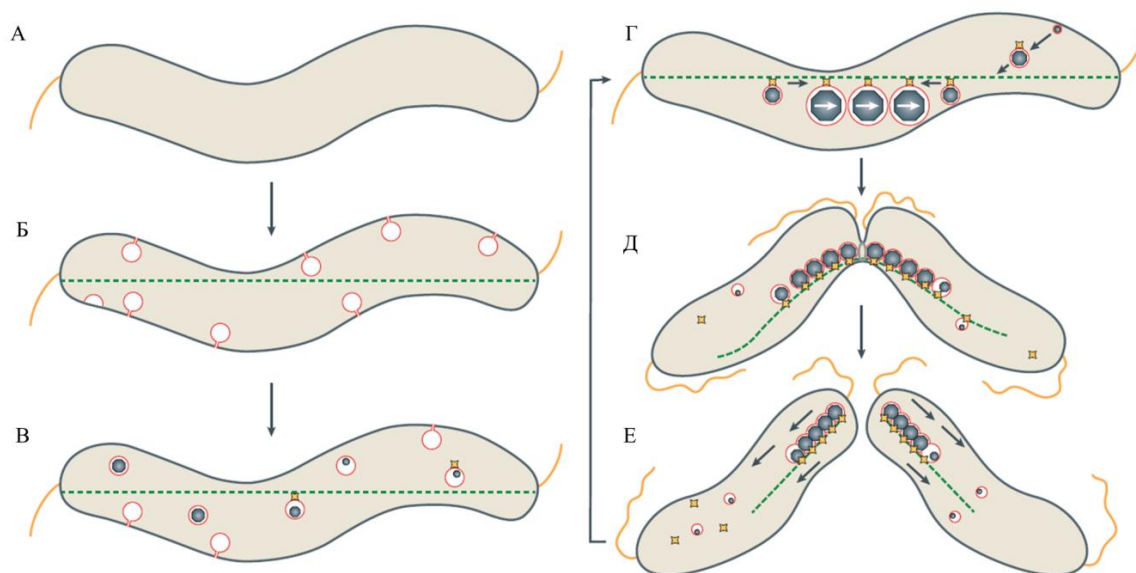


Рисунок 6. Схематичное изображение процесса формирования магнетосом и магнетосомных цепей у *Ms. gryphiswaldense* MSR-1^T. Красные круги - магнетосомные везикулы; зеленая пунктирная линия – филамент MamK; серые октаэдры – кристаллы магнетосом; желтые прямоугольники – белок MamJ. А) Клетка без магнетосом; Б) Формирование магнетосомных везикул путем инвагинации цитоплазматической мембраны; В) Транспорт железа внутрь везикулы и нуклеация кристалла; Г) Выстраивание магнетосом в цепочки путем взаимодействия белка MamJ с магнетосомной мембраной и филамента MamK; Д) Инициация деления клетки при помощи белка FtsZ (серое кольцо), изгиб магнетосомной цепи для уменьшения магнитостатической силы, что способствует равномерной сегрегации магнетосом в дочерние клетки; Е) Перемещение магнетосомной цепи вдоль MamK в середину клетки. Цитировано по (Uebe, Schüler, 2016)

Первый этап – инвагинация цитоплазматической мембраны с последующим образованием везикул. Второй этап – сортинг магнетосомных белков на мембране магнетосом. Третий этап - транспорт ионов железа Fe(II) и Fe(III), нуклеация и созревание кристалла магнетита. Четвертый этап – сборка отдельных магнетосом в цепочку.

Способность к инвагинации мембраны, как правило, зависит от наличия специфических белков, которые обеспечивают энергию, необходимую для этого процесса через мембранный скаффолдинг (Sweitzer, Hinshaw, 1998) или путем включения амфипатических спиралей в мембрану (Ford et al., 2002). Тем не менее, ни один ген МГО не имеет очевидной гомологии с известными мембранными белками, выполняющих подобную функцию у эукариот. Генетические исследования показывают, что *tamB* является наиболее важным геном для процесса инвагинации (Murat et al., 2010; Raschdorf et al., 2016; Uebe

et al., 2011). Биогенез магнетосомных везикул происходит непрерывно и неспецифично в нескольких местах, что говорит о том, что инвагинация мембран магнетосом является гораздо менее регулируемым процессом, чем инвагинация мембран во время образования везикул в эукариотических клетках (Faini et al., 2013).

Исследования белкового состава мембраны магнетосом позволяют предположить, что таргетинг белков представляет собой иерархический процесс, который включает в себя несколько различных механизмов, которые остаются плохо понятыми. Все изученные Mam и Mms белки были идентифицированы в очищенных магнетосомах, причем количество каждого белка варьировало в различных препаратах магнетосом (Tanaka et al., 2006). Содержание магнетосомных белков на мембране варьируется даже между отдельными магнетосомами, которые находятся на разных стадиях созревания, но расположенных в одной цепи (Tanaka, Arakaki, Matsunaga, 2010; Taoka et al., 2014).

После формирования мембраны магнетосом в везикулах начинает накапливаться железо. В зависимости от условий роста, более чем 99,5% от внутриклеточного железа в MSR-1 содержится в магнетосомах, которые могут составлять более чем 4% от сухой массы клетки (Grünberg et al., 2004). Было обнаружено, что поглощение железа и биоминерализация магнетита происходят при внеклеточных концентрациях железа приблизительно 20-50 мкМ, которые эквивалентны содержанию растворенного железа в придонных осадках, в которых МТБ наиболее многочисленны (Schuler, Baeuerlein, 1998).

Предполагается, что транспорт железа внутрь везикул отличается от основных путей транспорта железа клетки (Rahn-Lee, Komeili, 2013). Например, сидерофоры обнаружены у AMB-1 и некоторых других видов МТБ, но не у MSR-1 и, следовательно, их наличие не обязательно для синтеза магнетосом (Calugay et al., 2006). Также гены *fur* и *irrB*, кодирующие регуляторы транскрипции всех известных общих систем транспорта железа у MSR-1, не оказывают влияния на биоминерализацию магнетита, что подтверждено

опытами с делеционными мутантами по этим генам (Uebe et al., 2010; Wang et al., 2015a). В настоящее время появляется все больше доказательств того, что накопление железа в магнетосомных везикулах происходит по модели, предполагающей транспорт через цитоплазму клетки. Например, при делеции генов ГТФ-зависимых транспортеров Fe(II) *feoA1* и *feoB1*, которые распределены по всей цитоплазматической мембране и не обнаружены в мембране магнетосом, проявляется сильное ухудшение процесса биоминерализации (Rong et al., 2008). У МТБ часто присутствуют 2 формы транспортера железа FeoAB, одна из которых, FeoAB1, является специфичной для процесса формирования магнетосом, тогда как вторая, FeoAB2, вовлечена в общий транспорт железа клетки (Rong et al., 2008).

Магнетит – композит, состоящий из оксидов железа II и III. Его формирование наступает в узком окислительно-восстановительном диапазоне при соотношении 2 Fe(III) : 1 Fe(II). Было обнаружено влияние некоторых общих метаболических путей клетки в течение анаэробного и микроаэрофильного роста на биоминерализацию магнетита. Например, у штамма MSR-1 при делеции двух из шести цитозольных FeIII оксидоредуктаз нарушался процесс биоминерализации (Li et al., 2014a). При делеции гена *cbb3*, кодирующего кислородредуктазу, также ингибируется процесс биоминерализации магнетосом. Наконец, мутантные штаммы MSR-1, у которых были удалены ключевые гены пути денитрификации (*nar*, *nirS*, *norCB*), синтезировали магнетосомы с дефектами морфологии, размера, количества кристаллов и организации цепочки магнетосом (Li et al., 2012; Li et al., 2013; Li et al., 2014b).

Нуклеация кристалла магнетита происходит при $pH > 7$ и низком окислительно-восстановительном потенциале, при котором растворенные ионы железа начинают формировать кристаллическую фазу. В каждой везикуле формируется только один кристалл магнетита. Маленькие первичные кристаллы магнетита обнаруживаются в непосредственной близости от внутренней поверхности мембраны магнетосом, что свидетельствует о начале

формирования кристаллов на границе с мембраной магнетосом (Komeili et al., 2006).

Зрелые кристаллы магнетосом однородны по своему составу и имеют постоянный размер. Механизм контроля размеров кристалла остается неясен. Количество кристаллов магнетита, по-видимому, также жестко регулируются. Однако молекулярные и структурные механизмы, которые используются для обеспечения оптимального числа магнетосом, не были детально исследованы (Uebe, Schüler, 2016).

Магнетосомы организованы в линейные цепочки, в которых магнитные моменты отдельных магнетосом суммируются для увеличения общего магнитного ответа клетки. Поскольку цепочка магнитных диполей имеет присущую им тенденцию сворачиваться в замкнутые кольца или образовывать агрегаты, МТБ используют клеточные структуры для ее стабилизации. Эти структуры также прикрепляют магнетосомную цепочку так, чтобы вся клетка затем выравнивалась вдоль линий магнитного поля. Сборка магнетосомных цепей является результатом скоординированного влияния магнитных взаимодействий, которые происходят естественным образом между кристаллами магнетита, и механизмами активной сборки, которые опосредованы белками (Klumpp, Faivre, 2012). Криоэлектронные томограммы MSR-1 и AMB-1 показали существование пучков цитоскелетных филаментов, которые пересекают клетку в непосредственной близости от магнетосомных цепей (Scheffel et al., 2006). Эти филаменты сформированы белком MamK, который является актиноподобным белком, обнаруженным только у магнитотактических бактерий. Данный белок кодируется геном *tamK*, который является консервативным и находится внутри *tamAB* оперона (Schübbe et al., 2003).

У MSR-1 клетки дикого типа имеют одну или две смежные магнетосомные цепочки, которые имеют длину в $2/3$ от длины клетки и локализованы по центру клетки, в то время как мутанты с делецией гена *tamK* имеют более короткие фрагментированные цепочки, расположенные в

нецентральной позиции. Это говорит о том, что MamK играет роль в соединении коротких цепочек в одну и в расположении ее в центре клетки (Katzmann et al., 2010). Также было показано, что MamJ, также как и MamK, играет роль в сборке магнетосомных цепей в MSR-1. В мутантах с делецией *tamJ* магнетосомы отделяются от нити MamK и после отделения от этого каркаса агрегируют при помощи магнитного притяжения, что указывает на то, что MamJ представляет собой некий соединитель, который прикрепляет магнетосомы к MamK (Scheffel, Schüler, 2007). В соответствии с такой ролью, MamJ, как было показано, связывается также и с мембраной магнетосом (Grünberg et al., 2004). Различные фенотипы MSR-1 с делецией *tamJ* и *tamK* указывают на наличие дополнительных пока еще не идентифицированных детерминант формирования магнетосомной цепи. Недавно было обнаружено, что белок MamY задействован в формировании магнетосомных цепей у *Magnetospirillum* (Toro-Nahuelpan et al., 2019).

MamJ, по-видимому, не является универсальным медиатором сборки магнетосомных цепей, поскольку он был обнаружен только у *Magnetospirillum* spp., но не у других видов МТБ. Исследования показывают, что гомологи MamK присутствуют в геномах МТБ, и, в некоторых случаях вместе с другими актиноподобными белками (например, Mad28), предположительно функционируют в сборке магнетосомных цепей (Uebe, Schüler, 2016).

4.3. Происхождение и эволюция генов биоминерализации магнетосом.

Важным вопросом в исследовании МТБ является то, как возникли и распространились общие для всех МТБ гены, участвующие в образовании магнетосом. Первоначальное открытие связи грейгит- и магнетитпродуцирующих МТБ с двумя различными классами - *Deltaproteobacteria* и *Alphaproteobacteria*, соответственно, привели к предположению об их независимом эволюционном происхождении (DeLong, Frankel, Bazyliniski, 1993). В настоящее время, имея значительное количество информации о геномах и филогении МТБ, предполагается монофилетическое

происхождение генов синтеза магнетосом, то есть возникновение произошло один раз в процессе эволюции от одного общего предка. Большая часть доказательств этого утверждения появилась после открытия генов биоминерализации магнетосом у некультивируемых ММП класса *Deltaproteobacteria*- и у ‘*Ca. Magnetobacterium bavaricum*’, принадлежащего филуму *Nitrospirae*. Они оказались сходными генам, которые ранее были обнаружены только у магнитотактических *Alphaproteobacteria*. Однако монофилетическое происхождение, по-видимому, справедливо только для консервативных для всех МТБ магнетосомных генов. Такими являются гены оперона *mamAB* (Lefèvre et al., 2013b). В то же время, гены оперонов *mamGFDC* и *mms*, специфичные для магнитотактических *Alphaproteobacteria*, и *mad* гены, присутствующие только у магнитотактических *Deltaproteobacteria* и *Nitrospirae*, возможно, имеют полифилетическое происхождение. Также возможно, что *mamGFDC* и *mms* опероны и *mad* гены присутствовали у общего предка, но затем были утрачены в ходе эволюции у групп, у которых они отсутствуют в настоящее время (Lefèvre, Wu, 2013).

Еще одной гипотезой является возможность горизонтального переноса магнетосомных генов. Гены или геномные острова могут быть распределены среди различных бактерий посредством горизонтального переноса генов (HGT), способствуя эволюции бактериальных геномов (Juhas et al., 2009) и приобретению новых функций, таких как магнитотаксис. Было установлено, что некоторые культивируемые МТБ могут утратить способность формировать магнетосомы, вследствие утраты МГО. Кроме того, МГО подвергается перестройкам генов, делециям и дупликациям (Kolinko et al., 2011; Schübbe et al., 2003), что может объяснить образование спонтанных немагнитных мутантов. Типичные геномные острова обнаружены только в геномах *Magnetospirillum*, *Mv. blakemorei* и *D. magneticus*. В геномах других МТБ, таких как *Mc. marinus* (Schübbe et al., 2009), *Desulfamplus. magnetovallimortis* (Lefèvre et al., 2013a) и *Magnetospira* sp. QH-2 (Ji et al., 2014) МГО не имеют канонических особенностей геномного острова. К тому же у них не наблюдали

потерю магнитного фенотипа. Эти наблюдения привели к предположению о древнем приобретении магнетосомных генов у этих МТБ и их стабилизацию в хромосоме в ходе эволюции. Возможность горизонтального переноса магнетосомных генов наиболее вероятна для филогенетически близких видов, как, например, было показано для МТБ рода *Magnetospirillum* (Lefèvre et al., 2012b; Lefèvre, Wu, 2013).

С открытием новых МТБ было предположено, что общие магнетосомные гены присутствовали у предка современных представителей филумов *Proteobacteria*, *Nitrospirae* и *Omnitrophica* или у последнего общего предка штаммов *Proteobacteria*, *Nitrospirae*, *Omnitrophica*, ‘*Latescibacteria*’ и *Planctomycetes*. Впоследствии эволюционная история магнетосомных генов диверсифицировалась в каждой таксономической линии. Для МТБ, продуцирующих магнетит, вертикальное наследование с последующими множественными независимыми делециями, вероятно, является основной движущей силой развития магнитотаксиса. Однако, не исключены и события недавних горизонтальных переносов магнетосомных генов в пределах одного и того же класса или рода (например, у *Magnetospirillum*) (Lin et al., 2018).

Предполагается, что возникновение магнетосомных генов, которые кодируют белки синтеза грейгитовых магнетосом, обусловлено посредством дупликации и последующей дивергенции магнетосомных генов связанных с магнетитовым типом магнетосом. Однако эволюционная история грейгитовых магнетосом является предметом дискуссий из-за малого количества данных (Lefèvre, Bazyliniski, 2013; Lin et al., 2018).

ГЛАВА 5. МЕТАБОЛИЗМ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВ *RHODOSPIRILLACEAE* И *MAGNETOCOCCACEAE*.

Большинство культивируемых МТБ относятся к роду *Magnetospirillum* семейства *Rhodospirillaceae*, поэтому физиология этой группы является наиболее изученной. Все магнитотактические спириллы рода *Magnetospirillum* подвижны с помощью жгутиков, которые расположены на обоих концах клетки, и синтезируют одну цепочку кубооктаэдрических магнетосом, состоящих из магнетита (Schleifer et al., 1991). Физиология представителей порядка *Magnetococcales* изучена подробно для морских штаммов MC-1^T и IT-1 (Morillo et al., 2014; Schübbe et al., 2009), принадлежащих семейству *Magnetococcaceae*. Они синтезируют одну цепочку удлинённых магнетосом и подвижны с помощью двух пучков магнетосом, расположенных на одной стороне клетки.

Представители *Magnetospirillum* являются хемоорганогетеротрофами. Магнитоактивные кокки являются преимущественно хемолитоавтотрофами, но могут использовать ацетат или, в случае IT-1, сукцинат для хемогетеротрофного роста. MC-1^T и IT-1 используют обратный цикл трикарбоновых кислот (вЦТК) для фиксации CO₂ (Araujo et al., 2016; Williams et al., 2006). В геноме MC-1^T присутствуют три ключевых фермента вЦТК: 2-оксоглутарат редуктаза, пируват редуктаза и фумаратредуктаза. Однако, несмотря на обнаружение способности к расщеплению цитрата до ацетил-КоА и оксалоацетата у этих организмов, ни один из генов цитрил-КоА-синтетазы, цитрил-КоА-лиазы или АТФ-цитратлиазы (ACL) не был обнаружен в их геномах. У MO-1 также не были обнаружены эти гены. У этих микроорганизмов были найдены два гена, которые кодируют субъединицы ACL II типа (Mmc1_3638, Mmc1_3639) (Hügler, Sievert, 2011; Schübbe et al., 2009), что привело к предположению, что эта группа бактерий обладает другим типом ферментов, катализирующих расщепление цитрата. В геномах MC-1^T и IT-1, не были обнаружены гены, кодирующие фермент рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазу/оксигеназу (RuBisCo). Все ферменты, нужные для

окислительного ЦТК, присутствуют, но не были найдены гены, кодирующие необходимые ферменты глиоксилатного шунта (Ji et al., 2014). Ферменты, необходимые для глюконеогенеза, присутствуют в геноме MC-1^T. Также был обнаружен набор генов, необходимых для гликолиза, однако известно, что штамм не может утилизировать сахара. Было установлено отсутствие глюкозопермеазы и системы фосфотрансфераз, что может являться причиной неспособности использовать сахара для энергетического и конструктивного метаболизма, поскольку клетки неспособны к транспорту сахаров из окружающей среды (Schübbe et al., 2009). В геномах магнитотактических спирилл был найден неполный набор генов вЦТК. Также у них была обнаружена II форма RuBisCo (CbbM), однако способность к хемолитоавтотрофному росту не была подтверждена. Только для *Ms. gryphiswaldense* и штамма J10 была показана возможность автотрофного роста на восстановленных соединениях серы (Geelhoed et al., 2010).

Для представителей *Magnetospirillum* и *Magnetococcaceae* была показана способность к фиксации атмосферного азота (Araujo et al., 2016; Bazylnski et al., 2000; Bazylnski et al., 2013b). Организация *nif* генов у магнитотактических спирилл отличается от таковой у MC-1^T. У *Ms. magnetotacticum* был найден кластер *nifWVQXNEKDHNTZ* и *nifB* (Bazylnski, Williams, 2006), у '*Ms. magneticum*' был найден один кластер из 23 генов для фиксации азота, включая *nifWQXXNHZ* и *nifB*; кроме того, дополнительные гены *nifR* и *nifU* распределены по всему геному. Геном MC-1^T содержит кластер из 19 генов *nif* – *nifZVXNEYTKDHABQ*, также были обнаружены гены динитрогеназы и динитрогеназы редуктазы. Гены *nifR* и *nifU* также присутствуют, но находятся отдельно от основного кластера (Schübbe et al., 2009).

В геноме MC-1^T обнаружены 2 кластера генов, необходимых для диссимилиационной нитрат редукции (*narCBHGADF*) и не найдены гены ассимиляционной нитрат редукции. Геном '*Mf. australis*' IT-1 не содержит генов для последующих стадий денитрификации (гены *nir*, *nor* и *nos*), так же как и геномы некоторых видов *Magnetospirillum*. MC-1^T, в отличии от IT-1

имеет гены *norCBQ* и *norD*. Гены, кодирующие нитрит редуктазу, NO редуктазу и N₂O редуктазу, не были найдены в геноме MC-1^T. Штаммы MC-1^T и IT-1 не способны к анаэробному росту при использовании нитрата, хотя необходимые гены имеются в их геномах. Примечательно, что добавление нитрата не ингибирует фиксацию азота, что свидетельствует о неспособности штамма MC-1^T использовать нитрат как источник азота. Штаммы *Magnetospirillum* имеют способность к ассимиляционной и диссимиляционной нитратредукции и могут расти анаэробно и микроаэробно с нитратом в качестве конечного акцептора электронов. Гены для пути ассимиляционного восстановления нитратов (*nas*) не были обнаружены в геномах IT-1 и MC-1^T (Araujo et al., 2016)

В геноме MC-1^T обнаружены два гена пути ассимиляционного восстановления сульфата - *cysN* и *cysD*, кодирующие большую и малую субъединицу сульфат аденилилтрансферазы, осуществляющей превращение сульфата в аденозин-5'-фосфосульфат (АФС) и, затем, в 3'-фосфоаденозин-5' – фосфосульфат (ФАФС). Однако гены *cysH* и *cysI*, кодирующие дальнейшее образование сульфита и сероводорода, не были обнаружены. Таким образом, MC-1^T потенциально не способен к ассимиляционной сульфатредукции. Также в геноме MC-1^T не обнаружено ни одного гена для диссимиляционной сульфатредукции, что подтверждается неспособностью использовать сульфат как конечный акцептор электронов при анаэробном росте. MC-1^T способен использовать тиосульфат или сульфид в качестве доноров электронов при хемолитоавтотрофном росте. В геноме MC-1^T найдены 8 из 15 генов *sox* (*soxXYZAB*, *soxW*, *soxE*, *soxF*), отдельные копии генов *soxA* и *soxX* и по две дополнительные копии генов *soxZ* и *soxY*. В то время как у IT-1 были обнаружены два набора генов *sox*: *soxXYZAB* и *soxEFXU*, две копии *soxY*; *soxC* и *soxD* отсутствуют. Отсутствие необходимых для транспорта электронов генов *soxCD* может говорить о том, что IT-1 и MC-1^T окисляют тиосульфат до серы, которая либо запасается в клетке, либо выводится из нее. Было показано, что у MC-1^T серные глобулы образуются вне клетки. У IT-1 были найдены гены,

кодирующие сульфид-хинон-редуктазу, ключевой фермент для синтеза серных глобул, что подтверждает его способность формировать внутриклеточные серные глобулы. В геноме MC-1^T также найдены 9 из 15 генов *dsr* (*dsrAB*, *dsrC*, *dsrEFHJOP*), необходимых для окисления сульфита (Schübbe et al., 2009). В геноме '*Mf. australis*' присутствуют гены, кодирующие белки диссимиляционного восстановления сульфата до сульфита (диссимиляционная сульфат редуктаза - *DsrAB* и аденилсульфат редуктаза - *AprAB*). Также были найдены шесть *dsr* генов: *dsrAB*, *dsrC* и *dsrHFE*, которые сгруппированы близко к двум генам сульфит оксидазы, *yedY* и *yedZ*. Такое расположение генов *dsr* и *yed* также сходно в геномах штамма AMB-1 и *Ms. marinus* MC-1^T. Однако, гены, кодирующие мембранный комплекс *QmoABC*, ответственные за перенос электронов на *AprAB* в сульфатредуцирующих бактериях, не были обнаружены. '*Mf. australis*' IT-1 способен окислять сульфид, но не растет анаэробно с сульфатом в качестве акцептора электронов. '*Ms. magneticum*' содержит 12 генов *dsr* (*dsrABEFHCKMLOOP*), организованных в единый кластер. В то время как *Ms. magnetotacticum* содержит только 3 гена *dsr* (*dsrABC*).

Было продемонстрировано, что геномы морских магнитотактических кокков содержат как низкоаффинные, так и высокоаффинные переносчики фосфата (P_i) - *PstBAC*, *Pst1* и *Pst2*, а также высокоаффинный переносчик фосфонатов *PhnCDE*, что отражает адаптацию этих микроорганизмов к низкому количеству фосфора (Schübbe et al., 2009; Tyrrell, 1999). Схожий набор генов имеют штаммы *Magnetospirillum* AMB-1, MS-1^T и MSR-1^T. MC-1^T и IT-1 имеют гены, кодирующие ферменты полифосфаткиназы и экзополифосфатазы, которые участвуют в синтезе полифосфатных гранул (Morillo et al., 2014; Schübbe et al., 2009). Способность аккумулировать большое количество фосфора свидетельствует о важной роли магнитотактических кокков в круговороте фосфора, в частности, они могут выступать в роли «бактериального шаттла», благодаря которому фосфор из поверхностных вод

перемещается в более глубокие анаэробные слои (Rivas-Lamelo et al., 2017; Schulz-Vogt et al., 2019)

В геноме MC-1^T обнаружены гены, кодирующие субъединицы цитохром *c* оксидазы, которая может быть конечным акцептором O₂. Не были обнаружены гены, кодирующие супероксид дисмутазу и каталазу. Были найдены только гены цитохром *c* пероксидазы и алкил гидропероксид редуктазы, нужные для вывода пероксида водорода из клеток. Небольшое количество генов противодействия активным формам кислорода (АФК) подтверждает природу MC-1^T как облигатного микроаэрофила (Schübbe et al., 2009). В то же время у IT-1 систем защиты от АФК больше, чем у MC-1^T: цитохром *c* пероксидаза, алкил пероксид редуктаза, каталаза и супероксид дисмутаза. Это может говорить о том, что IT-1 показывает большую резистентность по отношению к АФК, чем MC-1^T. Схематичное изображение путей метаболизма у штамма IT-1 представлено на рисунке 7.

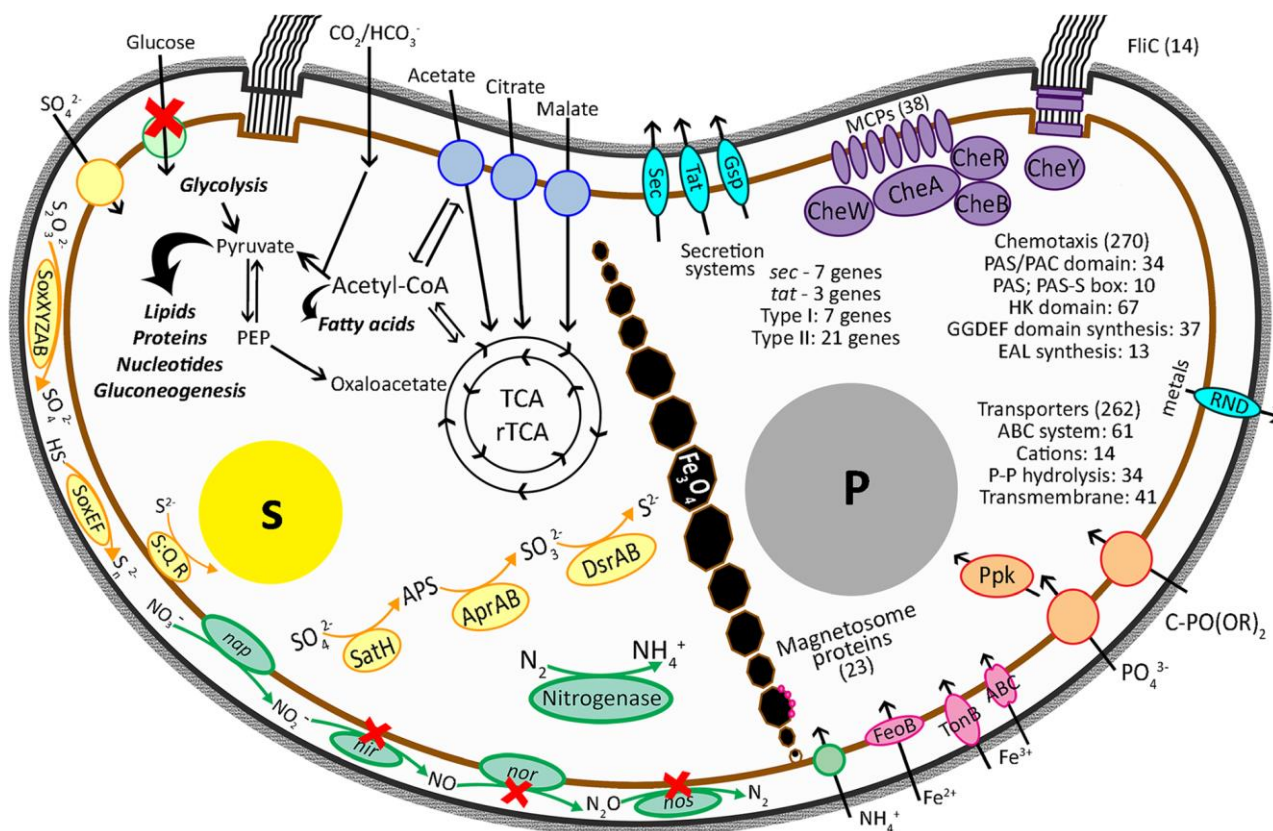


Рисунок 7. Схема путей метаболизма у штамма '*Magnetofaba australis*' IT-1. Цитировано по (Araujo et al., 2016)

ГЛАВА 6. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

6.1. Используемые штаммы.

В работе были использованы штаммы '*Magnetospirillum magneticum*' AMB-1 (ATCC 700264), *Ms. magnetotacticum* MS-1^T (DSM 3856), *Ms. gryphiswaldense* MSR-1^T (DSM 6361), *Ms. caucaseum* SO-1^T (BKM B-2936), *Ms. marisnigri* SP-1^T (BKM- B-2938), *Escherichia coli* DH10B (Thermo Fisher Scientific, США).

6.2. Материалы исследования.

В работе были исследованы образцы из трех пресноводных источников: река Москва, река Уда и озеро Белое Бордуковское. Проба из реки Москва была отобрана в черте г. Москва (район Строгино) (55.8141°N, 37.4141°E) в ноябре 2012 г. Образец из реки Уда был отобран в черте города Улан-Удэ (Республика Бурятия) (51.8229°N, 107.6199°E) в августе 2012 года. Проба из озера Белое Бордуковское (Шатурский район Московской области) (55°37'56"N, 39°44'38"E) была отобрана в октябре 2016 г.

Пробы представляли собой донные осадки (1 литр), отобранные с глубины около 0.5 метров. Также отбирали воду из источника в количестве двух литров. Пробы помещали в стерильные пластиковые контейнеры для транспортировки в лабораторию. Далее из них формировали микрокосмы, которые инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение нескольких недель. Микрокосмы были обозначены как «Уда», «Москва» и «Белое Бордуковское».

6.3. Получение обогащенной фракции клеток МТБ.

6.3.1. Сепарация МТБ методом магнитного обогащения в капилляре «race-track».

МТБ из микрокосма отбирали с помощью метода магнитной сепарации (Moench, Konetzka, 1978). Для этого магнит помещали с внешней стороны стенки микрокосма, на границе раздела фаз ил/вода. Образовавшееся через 1-3 часа у южного полюса магнита пятно с биомассой магнитотактических бактерий отбирали с помощью пипетки Пастера. 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 этого клетки помещали внутрь одного конца капилляра, который был заполнен стерильной жидкой средой или автоклавированной водой из источника, а к противоположному запаянному концу ставили магнит. Клетки двигались в сторону магнита, преодолевая барьер из ватной пробки за счет магнитотаксиса.

6.3.2. Сепарация МТБ методом магнитного обогащения в колонке МТВ-CoSe (Magnetotactic bacteria column separation).

Предложенный метод основан на применении колонок MACS® (Miltenyi Biotec, Германия) (Рис. 8). В пробирку объемом 50 мл отбирали керны (ил + вода, диаметр колонки 15 мм) из микрокосма, добавляли пятикратный PBS буфер (конечная концентрация 1.25х) и стеклянные шарики диаметром 150-200 мкм (Sigma-Aldrich, США). Состав PBS буфера (1х, г/л): NaCl – 8; KCl – 0.2; Na₂HPO₄ – 1.44; KH₂PO₄ – 0.24. Смесь помещали на качалку ThermoShaker TS-100 (Biosan, Латвия) при 100 об/мин. в течение 15 минут. Полученный гомогенат переносили в колбу Бунзена и фильтровали с использованием бумажного фильтра (диаметр пор 15-20 мкм) под вакуумным давлением для избавления от крупных почвенных частиц. Фильтрат переносили в пробирки объемом 50 мл и центрифугировали (Eppendorf Centrifuge 5804R, Германия) в течение 10-15 минут при 8000 g, супернатант сливали, оставляя около 2 мл.

Клетки ресуспендировали в оставшейся надосадочной жидкости. Далее колонку miniMACS (Miltenyi Biotec, Германия) промывали PBS буфером (1.25x), ставили на магнит и переносили на нее суспензию клеток. Затем промывали 2 мл PBS буфера (1.25x). Промывку проводили до полного отсутствия клеток в промывочной жидкости. Затем убрали колонку с магнита и проводили смыв МТБ 100 мкл PBS-буфера (1.25x) в чистую пробирку. При большой концентрации клеток МТБ проводили повторное нанесение на колонку miniMACS и дальнейшую промывку для полной очистки от немагнитотактических клеток. Наличие клеток МТБ и контаминации проверяли микроскопированием.

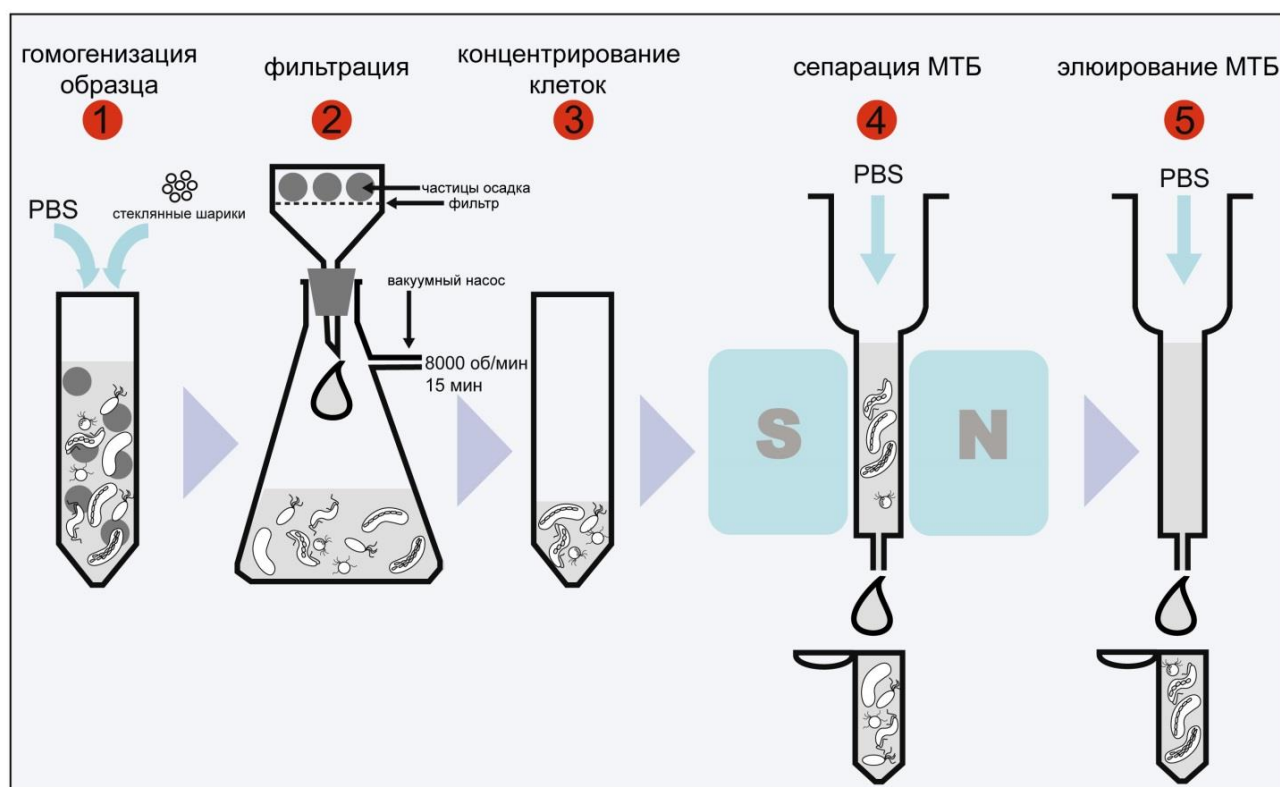


Рисунок 8. Схематичное изображение метода МТБ-CoSe. 1. Стадия гомогенизации образца. 2. Стадия фильтрации от крупных илистых частиц. 3. Удаление избыточного количества жидкости центрифугированием. 4) Сорбция МТБ на магнитной колонке за счет наличия магнетосом. Промывка большим количеством стерильного буфера для избавления от немагнитотактических бактерий. S и N - полюсы магнита. 5) Элюирование МТБ из колонки после убирания магнита.

6.4. Микробиологические методы исследования.

6.4.1. Составы питательных сред и условия культивирования.

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

Состав среды MSGM (г/л): KH_2PO_4 – 0.68; NaNO_3 – 0.12; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.05; ацетат натрия – 0.07; тартрат натрия – 0.37; сукцинат натрия – 0.37; тиогликолят натрия – 0.05; раствор цитрата железа (III) – 5.0 мл; комплекс микроэлементов – 1.0 мл; комплекс витаминов – 1.0 мл (каждого из трех растворов); раствор резазурина – 1.0 мл.

Состав среды DSM 380 (г/л): KH_2PO_4 – 0.68; NaNO_3 – 0.12; ацетат натрия – 0.07; тартрат натрия – 0.37; сукцинат натрия – 0.37; тиогликолят натрия – 0.05; раствор цитрата железа (III) – 2.0 мл; комплекс микроэлементов – 1.0 мл; комплекс витаминов – 1.0 мл (каждого из трех растворов); раствор резазурина – 1.0 мл.

Состав среды ACAM (г/л): HEPES – 2.38; NaNO_3 – 0.34; KH_2PO_4 – 0.1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.15; сукцинат натрия – 3.00; дрожжевой экстракт – 0.1; соевый пептон – 3.0; активированный уголь – 3.0; раствор цитрата железа (III) – 50.00 мл; тиогликолят натрия – 0.05.

Комплекс микроэлементов готовили согласно статье Брянцева с соавт. (Bryantseva et al., 1999). Состав микроэлементов (г/л): ЭДТА – 5.0; $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 2.0; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.03; H_3BO_3 – 0.3; $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.03; $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.02; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.03. Значение pH доводили до 3.0 – 4.0.

Комплекс витаминов состоял из трех растворов с различным значением pH. Каждый раствор готовился отдельно.

Раствор 1: Тиамин – 5 мг; пантотеновая к-та – 5 мг. Растворяли в 100 мл бидистиллята, закисленного соляной кислотой до pH 3.

Раствор 2: Биотин – 2 мг; парааминобензойная кислота – 5 мг; никотиновая к-та – 5 мг; пиридоксин – 10 мг. Растворяли в 100 мл 0.1 N NaOH.

Раствор 3: Фолиевая к-та – 2 мг; рибофлавин – 5 мг. Растворяли в 100 мл бидистиллята.

Раствор цитрата трехвалентного железа (10 mM): 2.45 г цитрата железа (III) растворяли в 1 л бидистиллята при нагревании.

Раствор резазурина (0.5 г/л): 5 г растворяли в 100 мл бидистиллята.

Среды разливали в бутылки или пробирки Хангейта, закрывали резиновыми септами с завинчивающимися колпачками, продували азотом для удаления кислорода из газовой фазы и, затем, стерилизовали. Стерилизацию сред проводили в течение 15 мин при 1 атм. Растворы цитрата железа (III) и витаминов стерилизовали фильтрованием через бактериологические фильтры с диаметром пор 0.2 мкм (Millipore, США). Микроэлементы готовили отдельно и стерилизовали автоклавированием при 0.5 атм. Стерильные растворы добавляли в среду перед использованием стерильным шприцем.

Для получения полужидкой и твердой питательных сред добавляли бактериологический агар до финальной концентрации 0.2 и 1.5%, соответственно.

В полужидкие среды после автоклавирования добавляли шприцем стерильный воздух до концентрации кислорода в газовой фазе 1%. Стерилизацию воздуха проводили путем пропускания через ультрафильтры диаметром 0,2 мкм (Millipore, США). После этого среды оставляли на ночь для установления градиента кислорода.

Для получения первичных накопительных культур значение pH среды доводили до 6.2 – 6.8. Культивирование проводили при 28°C в течение месяца.

Для получения большого объема биомассы жидкую среду DSM 380 готовили с добавлением соевого пептона в количестве 1.5 г/л. Культивирование проводили в 2 л среды в течение пяти дней при 28°C. В течение культивирования для подкисления среды вводили 1-4 мл подпитки из стерильного стока масляной кислоты (0.01M).

6.4.2. Изучение морфологии клеток

Морфологию клеток исследовали в просвечивающих электронных микроскопах JEM-100CX (JEOL, Япония) и Morgagni (FEI, США) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Электронные микрофотографии получали при помощи камеры MegaViewG2 CCD (Olympus, Япония). Просвечивающую электронную микоскопию высокого разрешения (ПЭМ ВР) проводили при ускоряющем напряжении 200 кВ на микроскопе JEM-2100 (JEOL, Япония) и Tecnai G2 F20 FEG (FEI, США) оборудованном камерой 4kx4k Gatan UltraScan 1000 CCD. Изображения высокого разрешения (HR) анализировали при помощи программы Digital Micrograph (Gatan, США). Тотальные препараты клеток для электронной микроскопии готовили без контрастирования. Способность к магнитотаксису определяли под световым микроскопом Eclipse E200 (Nikon, Япония), наблюдая изменение направления движения бактерий при повороте магнита, расположенного на предметном столике микроскопа.

Для флуоресцентной гибридизации *in situ* собранные клетки МТБ фиксировали в растворе параформальдегида (3%) в течение 1.5 ч. Каплю фиксированных клеток 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 (Pernthaler et al., 2001). Реакцию проводили на подложках с использованием 30% формамида в гибридизационном буфере. После этого на сетки наносили 4',6-диамидино-2-фенилиндол (ДАФИ) в концентрации 0.1 мкг/мл и выдерживали в течение 10 мин. Затем подложку помещали между предметным и покровным стеклом и исследовали с помощью микроскопа Zeiss AxioImager, оборудованного камерой AxioCam Mrc (Zeiss, Германия).

Олигонуклеотидные зонды были разработаны с помощью программы Decipher на основе исследуемых генов 16S рРНК (Wright et al., 2014). Специфичность зондов была проверена с помощью сервиса ProbeCheck (Loy et al., 2008). Специфичные зонды были синтезированы в компании ООО «Синтол» (Россия) и были мечены флуоресцентной меткой Cy3. Микс универсальных на

бактерии зондов EUB388I, EUB388II и EUB388III, меченных Alexa 488, использовали в качестве контроля (Daims et al., 1999). Последовательности используемых в работе зондов приведены в Таблице 1.

После проведения FISH ту же самую подложку исследовали с помощью электронного микроскопа Morgagni (FEI, США) при напряжении 80 кВ. Изображения клеток снимали в том же самом регионе, где был детектирован сигнал специфического зонда.

Таблица 1 - Зонды для FISH, используемые в работе

Зонд	Целевая группа	последовательность 5' - 3'	Флуоресцентная метка
Uda54-3	OTE UR-1	CAAGAGCAATTCCAGGGTTAAGCCCTGGGCTT	Cy3
LBB_01	OTE LBB_01	CCCCACAAAAGCGGTTTACGACCCGA	Cy3
LBB_02	OTE LBB_02	GCCGTGGCTTATTCTTAAGGTACCGT	Cy3
LBB_03	OTE LBB_03	CTCAGAGTCAGTCAAGACCCAGAA	Alexa 594
LBB_04	OTE LBB_04	TGTCCAACCGAGGTAAAAACAGCA	Alexa 594
EUB388I	Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Alexa 488
EUB388II	Bacteria	GCAGCCACCCGTAGGTGT	Alexa 488
EUB388III	Bacteria	GCTGCCACCCGTAGGTGT	Alexa 488

6.4.3. Выделение чистой культуры.

Чистые культуры МТБ выделяли методом предельных разведений в полужидкой среде MSGM и на твердой среде АСАМ. 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. Выросшие колонии на чашках Петри пересеивали в полужидкие среды. Колонии, выросшие в максимальном разведении в пробирках Хангейта, подвергали очистке с помощью метода магнитного обогащения в капилляре («race-track») и дополнительной серии последовательных разведений. Процедуру повторяли до получения чистой культуры. Чистоту контролировали с помощью микроскопирования.

6.4.4. Изучение физиологии штаммов.

Для исследования физиологии выделенных штаммов использовали среды DSM 380 и MSGM. Все эксперименты были проведены в трех повторностях.

Резазурин был исключен из среды. Рост культуры определяли через неделю культивирования на спектрофотометре SmartSpec3000 (Bio-Rad, США) при длине волны 565 нм.

Для определения оптимума pH среды бактерии культивировали при различных начальных значениях pH (4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 6.8, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0 и 10.0), которые задавали путем добавления 10% NaOH или 10% HCl. Оптимальную температуру роста определяли культивированием при различных температурах (15°C, 18°C, 25°C, 28°C, 30°C, 32°C, 37°C, 42°C и 50°C).

Для определения отношения к солености в среду добавляли NaCl в конечной концентрации от 0 до 5% (0, 0.05, 0.1, 0.5, 0.7, 1, 1.5, 2, 3, 4 и 5 %).

Для определения возможности роста с использованием различных акцепторов электронов, клетки выращивали на среде MSGM или DSM 380 с сукцинатом, в которой нитрат натрия заменяли хлоридом аммония и удаляли кислород в газовой фазе продуванием азотом. В качестве возможных акцепторов электронов исследовали нитрат, сульфат, перхлорат и нитрит. Использование различных доноров электронов оценивали на питательных средах с кислородом в качестве акцептора электронов, заменяя ацетат, сукцинат и тартрат натрия на используемый субстрат в концентрации 0.5-1.0 г/л. Для определения спектра используемых бактерией субстратов использовали: ацетат, малат, пируват, лактат, сукцинат, цитрат, тартрат, пропионат, бутират, глицерол, тиосульфат, этанол, сахароза, глюкоза, мальтоза, лактоза, фруктоза. Все эксперименты по определению используемых субстратов были проведены в трех пересевах. При исследовании роста с тиосульфатом, добавляли NaHCO_3 в конечной концентрации 0.5 г/л в качестве источника углерода. Используемые субстраты готовили в виде концентрированных растворов и стерилизовали автоклавированием или, в случае сахаров, фильтрованием и вносили в питательные среды стерильными шприцами.

Для определения отношения к кислороду клетки растили на жидких средах, из которых был полностью удален кислород. Количество кислорода

варьировали путем добавления стерильного воздуха (исходя из содержания кислорода в воздухе - 21%). Также были сформированы пробирки с полной аэрацией без добавления восстанавливающего агента и с полной аэрацией при добавлении восстанавливающего агента - тиогликолята натрия (0.05 г/л). Рост культуры определяли измерением оптической плотности.

Каталазную активность определяли путем добавления к суспензии клеток 3% перекиси водорода. Оксидазную активность определяли путем окрашивания колоний культуры 1% тетраметил-н-фенилендиаминтетрахлоридом.

Активность нитрогеназы определяли ацетиленовым методом согласно (Bazyłinski et al., 2000). Для этого клетки растили на полужидкой среде, в которой нитрат натрия заменяли на хлорид аммония. Газовую фазу продували стерильным азотом. Через неделю культивирования, газовую фазу продували стерильным аргоном и добавляли ацетилен. Через день активность нитрогеназы измеряли на газовом хроматографе, регистрируя образование этилена в газовой фазе. Культуру *Ms. gryphiswaldense* MSR-1^T использовали в качестве положительного контроля. В качестве отрицательного контроля использовали незасеянную среду и культуру, росшую на среде с нитратом натрия.

6.4.5. Анализ состава жирных кислот.

Методом газовой хроматографии в комбинации с масс-спектрометрией (ГХ-МС) были определены составы жирных кислот (ЖК). Для этого клетки выращивали на среде DSM 380 с соевым пептоном в течение 5 дней при 28°C в микроаэрофильных условиях. Биомассу собирали центрифугированием и высушивали. Экстракцию жирных кислот из высушенных образцов проводили при помощи кислого метанолиза в 0.4 мл HCl (1.2 M) в метаноле при 80°C в течение 1 часа. Полученные метиловые эфиры жирных кислот двукратно экстрагировали с 0.2 мл гексана. Затем смесь эфиров в количестве 1-2 мкл вводили в инжектор ГХ-МС системы AT-5850/5973 (Agilent Technologies, США). Хроматографическое разделение пробы осуществляли на капиллярной колонке с метилсиликоновой привитой фазой HP длиной 5 м. Температуру анализа задавали от 140 °C до 320 °C с шагом 7 °C в минуту. Далее для

определения состава основных липидных компонентов использовали квадрупольный масс-спектрометр в режиме полного сканирования и ионизацией электронов около 70 эВ. Каждое вещество было подтверждено его масс-спектром и анализом базы данных масс-спектров библиотеки NIST.

Состав жирных кислот был определен д.б.н Осиповым Георгием Андреевичем и к.х.н. Быстровой Ольгой Витальевной (Международный Аналитический Центр ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН).

6.5. Методы молекулярной биологии и биоинформатики.

6.5.1. Выделение ДНК.

ДНК выделяли с помощью коммерческого набора DNeasy PowerSoil kit (Qiagen, Нидерланды), следуя рекомендациям производителя, и с помощью модифицированного щелочного метода Бирнбойма-Доли и технологии Wizard (Promega, США) (Булыгина и др., 2002). Биомассу бактерий суспендировали в 100 мкл буфера I (50 mM трис-HCl, pH 8.0; 10 mM ЭДТА; 50 мкг/мл панкреатической РНКазы) до получения гомогенной суспензии. Затем добавляли 100 мкл лизирующего буфера II (0.2 M NaOH; 1% SDS), после чего смесь инкубировали при 65 °C в течение 20-30 минут и затем охлаждали до температуры 20-25 °C и добавляли 100 мкл нейтрализующего буфера III (2.5 mM ацетата калия, pH 4.5). После перемешивания на вортексе смесь центрифугировали при 10000 g в течение 10 минут. Отбирали надосадочную жидкость в чистую пробирку и добавляли 300 мкл смолы Wizard MaxiPreps, после чего выделение ДНК проводили согласно рекомендациям фирмы Promega (США) для набора Wizard DNA Purification System.

Высокомолекулярную ДНК из больших объемов биомассы чистых культур получали с помощью модифицированного СТАВ – метода (Wilson, 2001). К биомассе, в количестве 50 мг, добавляли 400 мкл ТЕ-буфера (10 mM трис-HCl, 1 mM ЭДТА) и 25 мкл 10% SDS. Пробу перемешивали с помощью механического гомогенизатора RW 16 basic (IKA, Германия), добавляли 20 мкл протеиназы К (20 мг/мл) и инкубировали 60 минут при 37°C. После окончания

инкубации к пробе добавляли 100 мкл 5М NaCl и 160 мкл СТАВ – буфера (5% СТАВ, 0.35М NaCl). К полученной смеси прибавляли 20 мкл РНКазы (10 мг/мл), перемешивали и икубировали 10 минут при 65 °С. Затем добавляли равный объем хлороформа и тщательно перемешивали. Центрифугировали 10 минут при 13 000 об/мин для разделения фаз. Верхнюю фазу отбирали в чистую пробирку, смешивали с изопропанолом в количестве 0.6 от объема пробы и инкубировали 30 мин при 4 °С. Центрифугировали 10 минут при 13 000 об/мин. Супернатант удаляли, осадок промывали 70% этанолом и высушивали на воздухе. Полученную ДНК растворяли в 50 мкл деионизированной воды. Концентрацию ДНК измеряли при помощи спектрофотометра SmartSpec3000 (BioRad, США). Качество и количество полученной ДНК оценивали визуально при помощи электрофореза в 1% агарозном геле. Очищенную ДНК хранили при -20°С.

6.5.2. Амплификация фрагментов исследуемых генов.

Амплификацию исследуемых фрагментов генов проводили с использованием реакционного буфера следующего состава: 1х буфер (17 мМ (NH₄)₂SO₄, 67 мМ трис-НСl, рН 8.8, 2 мМ MgCl₂); 12.5 нмоль каждого из dNTP, 5 (10) мкл ДНК-матрицы; по 1.6 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК полимеразы BioTaq (Диалат ЛТД, Россия). Для амплификации гена *mamK* в буфер дополнительно добавляли бычий сывороточный альбумин до конечной концентрации 0.04%. Список использованных в работе праймеров приведен в Таблице 2.

Таблица 2 - Список праймеров, использованных в работе.

Праймер	Последовательность 5' - 3'	Целевой ген	Ссылка
mamK_79F	TNGGNDTHGAYYTNGGNACNTC	<i>mamK</i>	-
mamK_86F	GNATHGAYYTDGGNACNT	<i>mamK</i>	-
mamK_521R	CVACNNNRAANGGYTCNG	<i>mamK</i>	-
mamK_577R	GTNCCNGCVCCDATRTC	<i>mamK</i>	-
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S pPHK	(Lane, 1991)
1492R	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	16S pPHK	(Lane, 1991)

Температурно-временной профиль реакции амплификации фрагментов гена 16S рРНК бактерий: первый цикл – 94 °С x 5 мин, 55°С x 1 мин, 72 °С x 2 мин; последующие 35 циклов – 94 °С x 1 мин, 55 °С x 1 мин, 72 °С x 2 мин; окончательная полимеризация – 72 °С x 7 мин.

Температурно-временной профиль реакции амплификации фрагментов гена *tamK*: стадия инициации – 95 °С × 3 мин, первые четыре цикла – 95 °С × 30 с, 58 °С × 40 с, 72 °С × 1 мин; следующие 36 циклов – 95 °С × 30 с, 52 °С × 40 с, 72 °С × 1 мин; завершающий этап – 72 °С × 7 мин. Целевой фрагмент получали с использованием двухстадийной ПЦР. Для первой стадии амплификации использовали пару праймеров *tamK*_79F – *tamK*_577R, после чего полученный продукт использовали в качестве матрицы для второй стадии наработки продукта при помощи праймеров *tamK*_86F и *tamK*_521R.

6.5.3. Детектирование продуктов ПЦР.

Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 1% агарозном геле, при напряженности поля 6 В/см и документировали с помощью системы BioDocAnalyze (Biometra, Германия) по свечению бромистого этидия. Для анализа отбирали 5 мкл реакционной смеси и добавляли 1 мкл краски следующего состава: 50% глицерина, 6х ТАЕ буфер (0.24 М трис-ацетат; 0.006 М ЭДТА), 0.025% бромфеноловый синий; 0.025% ксилен-цианол.

6.5.4. Очистка ПЦР-продуктов

Полученные ПЦР-продукты очищали от посторонних примесей и неспецифичных продуктов реакции при помощи электрофореза в легкоплавкой агарозе (0.8%) с применением набора Wizard PCR Preps (Promega, США), согласно рекомендациям производителя. Очищенные ампликоны хранили при -20°С.

6.5.5. Клонирование ПЦР-продуктов.

Очищенные ПЦР-фрагменты генов лигировали в вектор pGEM-T EasySystem (Promega, США), согласно рекомендациям производителя, и

трансформировали в штамм *E. coli* DH10B с помощью электропорации с использованием мультипоратора (Eppendorf, США). Трансформированные клетки инкубировали в течение одного часа в жидкой среде SOB следующего состава (г/л): триптон – 20.0; дрожжевой экстракт – 5.0; NaCl – 0.5; KCl – 0.186. Затем подросшую культуру рассеивали на чашки с агаризованной средой LB состава (г/л): триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 10; агар - 20, содержащей 50 ед/мл ампициллина, 50 мкг/мл изопропил β -D-тиогалактопиранозид (IPTG) и 40 мкг/мл х-галактозы (X-GAL) и инкубировали ночь при 37°C. Скрининг клонов проводили с помощью цветной селекции. Колонии, содержащие вставку (белого цвета) пересеивали в жидкую среду LB с ампициллином и выращивали в течение ночи при 37°C.

6.5.6. Выделение плазмидной ДНК.

Ночную культуру *E. coli* центрифугировали 4 мин. при 10000 g и удаляли супернатант. Биомассу ресуспендировали в 100 мкл буфера I (50 mM трис-HCl, pH 8.0; 10 mM ЭДТА; 50 мкг/мл панкреатической РНКазы). Далее добавляли 100 мкл буфера II (0.2 M NaOH; 1% SDS) и аккуратно перемешивали наклоном пробирки. Затем добавляли 100 мкл буфера III (2.5 mM ацетата калия, pH 4.5), перемешивали и центрифугировали 10 мин. при 10000 g. Супернатант переносили в чистую микроцентрифужную пробирку, добавляли 200 мкл изопропанола, перемешивали и центрифугировали при 10000 g в течение 10 минут. Осадок промывали 70% спиртом, высушивали на воздухе и растворяли в 50 мкл деионизированной воды. Выделенную плазмиду анализировали при помощи электрофореза в 1 % агарозном геле.

6.5.7. Секвенирование ПЦР-фрагментов

Секвенирование проводили по методу Сэнгера с использованием научного оборудования ЦКП «Биоинженерия», ФИЦ Биотехнологии РАН. Был задействован секвенатор ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием набора реактивов BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit

(Applied Biosystems, США), согласно рекомендациям производителя. Вставка гена *tamK* была секвенирована с использованием праймера M13F, гены 16S рРНК секвенировали с использованием праймеров 341F, 530F, 1114F и 519R (Lane, 1991; Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989).

6.5.8. Секвенирование и сборка геномной ДНК

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) с помощью парно-концевых чтений длиной 150 п.о или одноконцевых чтений длиной 220 п.о. Качество необработанных чтений проверяли с помощью FastQC v. 0.11.7 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), после чего некачественные чтения удаляли с помощью Trimmomatic v. 0.36 (Bolger, Lohse, Usadel, 2014). Отфильтрованные по качеству чтения были собраны *de novo* с помощью программы SPAdes v. 3.12.0 (Bankevich et al., 2012). Аннотацию генома проводили с использованием PGAP (Prokaryotic Genome Annotation Pipeline), предоставляемого NCBI (Tatusova et al., 2016). Для оценки качества сборки генома использовали инструмент (QUAST) (Gurevich et al., 2013).

Биннинг (реконструкцию) матегеномов проводили с помощью трех различных подходов (MaxBin2 (Wu et al., 2014), MyCC (Lin, 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., 2015) 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) с командой «lineage_wf» и настройками по умолчанию.

6.5.9. 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, Faulkner, Hugenholtz, 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). Конкатенированные последовательности белков получали с помощью Gblocks (Castresana, 2000). Филогенетический анализ проводили с помощью программ MEGA5.0 (Tamura et al., 2011) и IQ-TREE (Nguyen et al., 2015). Выбор эволюционной модели осуществляли с помощью ModelFinder (Kalyaanamoorthy 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). Попарный процент консервативных белков (POCP) был рассчитан с помощью скрипта runPOCP.sh (Grouzdev et al., 2018), основанного на описанном ранее подходе (Qin et al., 2014).

Консервативная доменная структура белков была проанализирована с помощью Batch Web CD-Search Tool при установленных параметрах по умолчанию (Marchler-Bauer et al., 2017). Функциональный анализ белков выполняли с помощью InterProScan и gapped BLAST (Altschul et al., 1997; Quevillon et al., 2005). Реконструкция метаболизма некультивируемого кокка была проведена с помощью сервиса KEGG Mapper (Kanehisa et al., 2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 7. РАЗНООБРАЗИЕ МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ В РЕКЕ МОСКВА.

7.1. Изучение морфологии клеток и магнетосом МТБ, выявленных в пробах из реки Москва.

В исследуемом микрокосме «Москва» среди МТБ преобладали кокки. На основании размеров клеток, количества цепочек и размеров магнетосом, а также наличия включений магнитотактические кокки были отнесены к 5 различным морфотипам (Рис. 9А-Г). Размеры клеток составляли 0.8 – 1.2 мкм. Все выявленные МТБ синтезировали удлинённые призматические кристаллы магнетосом размером 35-110 нм (по длинной оси кристалла), организованные в одну (Рис. 9В) или две (Рис. 9А, Б, Г) цепочки. Некоторые клетки содержали крупные электронно-плотные включения, вероятно, полифосфаты (Рис. 9Б). Эти наблюдения коррелировали с данными предыдущих исследований, в которых доминирующим морфотипом МТБ в пресноводных донных осадках также были магнитотактические кокки (Lin et al., 2009; Lin, Pan, 2010).

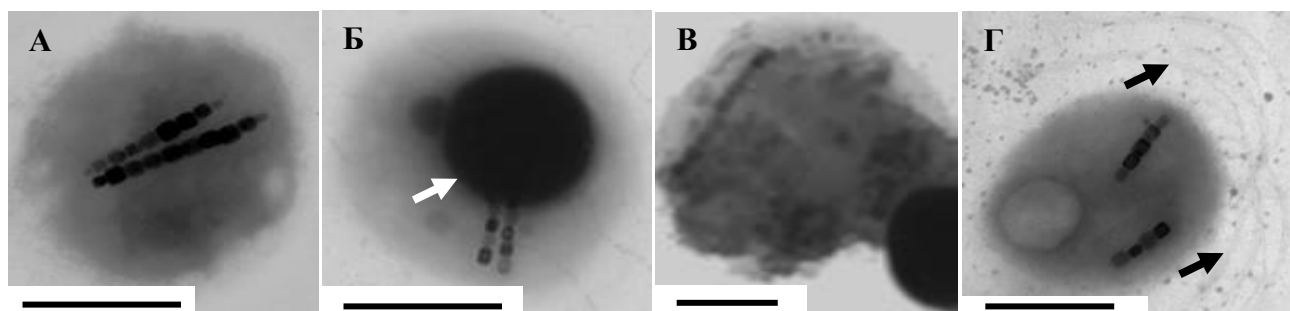


Рисунок 9. Фотографии МТБ из микрокосма «Москва», полученные с помощью ПЭМ. Белые стрелки – включения, черные стрелки – жгутики. Размер линейки 0.5 мкм.

7.2. Филогенетический анализ МТБ.

Библиотека клонов фрагментов гена 16S рРНК, после удаления химерных последовательностей и последовательностей, не имеющих сходства с

известными группами МТБ и отнесенных таким образом к немагнитотактическим бактериям, включала 140 последовательностей, которые были объединены в 13 операционных таксономических единиц (ОТЕ) с уровнем сходства $\geq 98\%$ (Рис. 10).

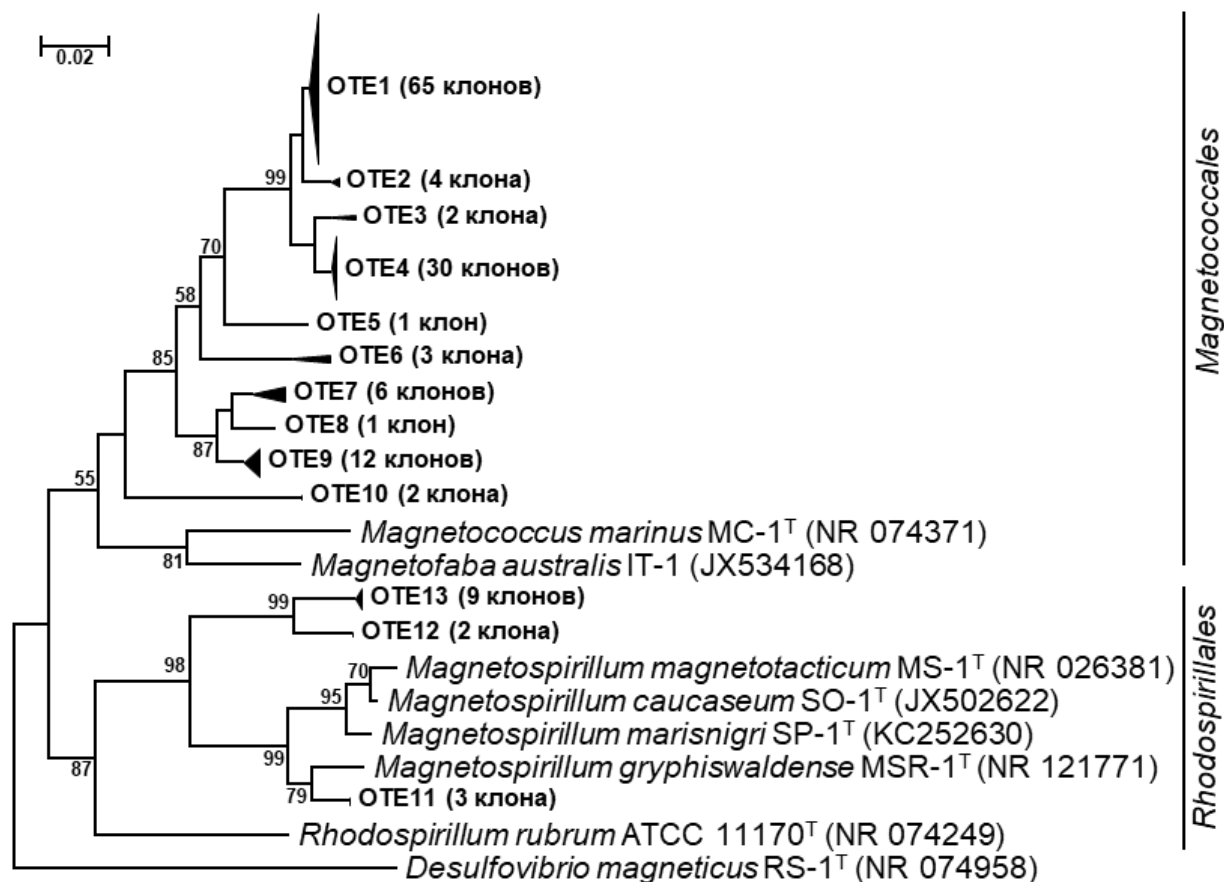


Рисунок 10. Филогенетическое дерево, построенное на основании последовательностей гена 16S рРНК. Алгоритм – maximum likelihood. Достоверность ветвления проверена с помощью «bootstrap»-анализа 500 альтернативных деревьев. Шкала, 0.02 замены на нуклеотидную позицию.

Все последовательности библиотеки принадлежали представителям филума *Proteobacteria*, причем свыше 90% (ОТЕ1-ОТЕ10) кластеризовались внутри порядка *Magnetococcales*. Уровень сходства этих ОТЕ с ближайшим культивируемым представителем МТБ *Magnetococcus marinus* MC-1^T 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 (ОТЕ11; 12; 13), принадлежащих бактериям порядка *Rhodospirillales*. К порядку *Rhodospirillales* относятся валидно

описанные виды МТБ, принадлежащие роду *Magnetospirillum*. Уровень сходства между последовательностями ОТЕ11, 12 и 13 и ближайшим типовым представителем рода *Ms. gryphiswaldense* MSR-1^T составил 97%, 91% и 91% соответственно.

По результатам анализа сходных последовательностей гена 16S рРНК из базы данных GenBank было обнаружено, что большинство последовательностей полученной нами библиотеки последовательностей генов 16S рРНК имели высокий уровень сходства (>98%) с таковыми, выявленными в популяциях МТБ из других пресных водоемов, находящихся в разных географических точках. Девять из десяти выявленных ОТЕ, принадлежащих магнитотактическим коккам, имели высокий уровень сходства с последовательностями гена 16S рРНК пресноводных магнитотактических кокков, выявленных в озерах и реках Китая, Германии и Франции. Например, ОТЕ1 (46.4 % от анализируемой библиотеки генов «Москва») включал в себя последовательность магнитотактического кокка CS-02 (JX402652) озера Кимзее (Германия). Данный филотип также являлся доминирующим в исследовании разнообразия МТБ этого озера (Kolinko et al. 2013). Размер клеток CS-02 составлял около 1.5 мкм, они были способны синтезировать удлинённые призматические магнетосомы, сформированные в две цепочки. Один из идентифицированных нами морфотипов (Рис. 9А) схож с CS-02, однако точное установление соответствия морфотипа и филотипа требует дополнительных исследований. ОТЕ3 имел высокий уровень сходства с последовательностями генов 16S рРНК бактерий, полученных из придонных осадков водоемов Франции (Lin et al., 2013; Spring et al., 1995). Исключение составляют уникальные для реки Москвы ОТЕ10 и ОТЕ13, уровень сходства которых с ближайшими некультивируемыми МТБ составлял: 94% - с магнитотактическим кокком YLSI_2 и 97% - с магнитотактической спириллой YLSI_30, соответственно. Данные о сходстве с представителями МТБ, обнаруженными в других исследованиях, суммированы в Таблице 3.

Таблица 3 - Распределение числа клонов в ОТЕ и ближайшие некультивируемые представители МТБ

ОТЕ	Количество клонов	Ближайшие по GenBank	Место отбора	Сходство, %	Ссылки
1	65	HQ437597	оз. Юй Юань, Китай	99	(Lin et al., 2012)
		JX402652	оз. Кимзее, Германия	99	(Kolinko et al., 2013)
		JX295561	Юаньминъюань, Китай	99	(Lin et al., 2013)
		JX295362	канал в г. Сиань, Китай	99	
		JX295287	р. Сианг, Китай	99	
		JX295079	канал в г. Сиань, Китай	100	
		GQ468510	оз. Миюн, Китай	100	(Lin, Pan, 2010)
2	4	HQ437591	оз. Юй Юань, Китай	98	(Lin et al., 2012)
3	2	KX270019	оз. Павин, Франция	99	-
4	30	JX295281	р. Сианг, Китай	99	(Lin et al., 2013)
		JX295326	оз. Синцин, Китай	99	
		X61605	оз. Кимзее, Германия	99	(Spring et al., 1992)
		HQ437586	оз. Бэйхай, Китай	99	(Lin et al., 2012)
		HQ437625	оз. Миюн, Китай	99	
		EU780677		99	(Lin et al., 2009)
		GQ468517		99	(Lin, Pan, 2010)
5	1	JX134736	канал в г. Сиань, Китай	99	(Lin et al., 2013)
		JX295421	Юаньминъюань, Китай	98	
		JX295292	р. Сианг, Китай	98	
		JX295502	ручей в горах Юэлу, Китай	98	
		GQ468519	оз. Миюн, Китай	99	(Lin, Pan, 2010)
		AJ863156	оз. Кимзее, Германия	99	(Flies et al., 2005)
		X81183	пруд Тюбинген, Германия	99	(Spring et al., 1995)
		HQ437532	оз. Куньмин, Китай	98	(Lin et al., 2012)
6	3	EU780675	оз. Миюн, Китай	99	(Lin et al., 2009)
		GQ468513		99	(Lin, Pan, 2010)
		JX295415	ручей в горах Юэлу, Китай	99	(Lin et al., 2013)
7	6	JX29551	Юаньминъюань, Китай	99	(Lin et al., 2013)
		JX295331	оз. Синцин, Китай	99	
		HQ437517	оз. Куньмин, Китай	99	(Lin et al., 2012)
		HQ437594	оз. Юй Юань, Китай	99	
		KC252625	р. Аксай-Курмоярский, Россия	99	(Дзюба, 2013)
		X81188	оз. Кимзее, Германия	99	(Spring et al., 1995)
8	1	HQ437615	оз. Юй Юань, Китай	98	(Lin et al., 2012)
		HQ437510	оз. Куньмин, Китай	98	
		AJ863155	оз. Кимзее, Германия	98	(Flies et al., 2005)
		GU979423	оз. Мид, США	98	(Lefevre et al., 2011d)
		GQ468507	оз. Миюн, Китай	99	(Lin, Pan, 2010)

Таблица 3 Продолжение

OTE	Количество клонов	Ближайшие по GenBank	Место отбора	Сходство, %	Ссылки
9	12	HQ437567	оз. Бэйхай, Китай	98	(Lin et al., 2012)
		HQ437592	оз. Юй Юань, Китай	98	
		HQ437518	оз. Куньмин, Китай	98	
		JX295445	ручей в горах Юэлу, Китай	98	(Lin et al., 2013)
10	2	JX295363	ручей в горах Юэлу, Китай	94	(Lin et al., 2013)
11	3	JF490038	Колобское водохранилище, США	99	(Lefevre et al., 2012b)
		JF490040	Оз. Моно, США	99	
		Y17390	пруд МакФарланда, США	99	(Schüler et al., 1999)
		JX295191	пруд острова Санта-Каталина, США	99	(Lin et al., 2013)
12	2	JX295344	оз. Синцин, Китай	99	(Lin et al., 2013)
		JX295236	канал в г. Сиань, Китай	99	
		JX295383	ручей в горах Юэлу, Китай	98	
13	9	JX295383	ручей в горах Юэлу, Китай	97	(Lin et al., 2013)

Результаты филогенетического анализа сообщества на основании последовательностей генов 16S рРНК демонстрировали преобладание представителей порядка *Magnetococcales*, что подтверждало морфологические данные. Последовательности пресноводных кокков формировали на филогенетическом дереве кладу, отдельную от описанных культивируемых морских магнитотактических кокков *Magnetococcus marinus* MC-1^T и *Magnetofaba australis* IT-1, отнесенных к семейству *Magnetococcaceae* порядка *Magnetococcales*. Такая кластеризация указывает на вероятную принадлежность пресноводных представителей к отдельному семейству. Однако отсутствие представителей этой группы МТБ в чистой культуре оставляет этот вывод на уровне предположения. Кроме того, разделение на филогенетическом дереве пресноводных и морских магнитотактических кокков согласуется с выявленной ранее зависимостью состава сообществ МТБ от солености (Lin et al., 2012).

Полученные данные отражают структуру сообщества МТБ в конкретном географическом регионе и дают полезную информацию для будущих исследований сообществ МТБ.

ГЛАВА 8. РАЗНООБРАЗИЕ МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ В ПРОБАХ ИЗ РЕКИ УДА.

8.1. Получение обогащенной фракции МТБ из р. Уда и анализ их разнообразия.

Согласно данным экологического мониторинга, вода в р. Уда, в месте отбора проб, имела рН 8.04 и температуру 11°C. Вода характеризуется низким содержанием фосфатов, нитритов, нитратов и аммонийных солей. Данные физико-химических характеристик воды в месте отбора проб представлены в Таблице 4.

Таблица 4. Физико-химические параметры воды из р. Уда в месте отбора проб

рН	8,04	HCO_3^- , мг/л	65,3
O_2 , мг/л	9,49	Cl^- , мг/л	1,20
NH_4^+ , мг/л	0,00	SO_4^{2-} , мг/л	6,50
NO_2^- , мг/л	0,00	P, мг/л	0,007
NO_3^- , мг/л	0,01	Fe, мг/л	0,45

В результате применения магнитной сепарации в капилляре из микрокосма «Уда» были получены клетки МТБ. С помощью световой микроскопии было обнаружено, что во фракции клеток присутствовали только магнитотактические кокки. Микроскопические исследования с помощью ПЭМ показали, что все обнаруженные МТБ имели кокковидную форму и содержали неорганизованные в цепочки магнетосомы.

Клональная библиотека микрокосма «Уда» состояла из 71 последовательности гена 16S рРНК. Полученные последовательности были объединены в две ОТЕ с уровнем сходства 99%. На филогенетическом дереве полученные ОТЕ формировали отдельную от морских представителей кладу внутри порядка *Magnetococcales*. Одна ОТЕ, обозначенная как *Magnetococcales bacterium* UR-1, или сокращенно UR-1, являлась доминирующей (87% от клональной библиотеки) (Рис. 11). Уровень сходства с геном ближайшего валидно описанного штамма *Ms. marinus* MC-1^T семейства *Magnetococcaceae*

порядка *Magnetococcales* составил 89.6%, что говорит о возможной принадлежности ОТЕ UR-1 к новому семейству.

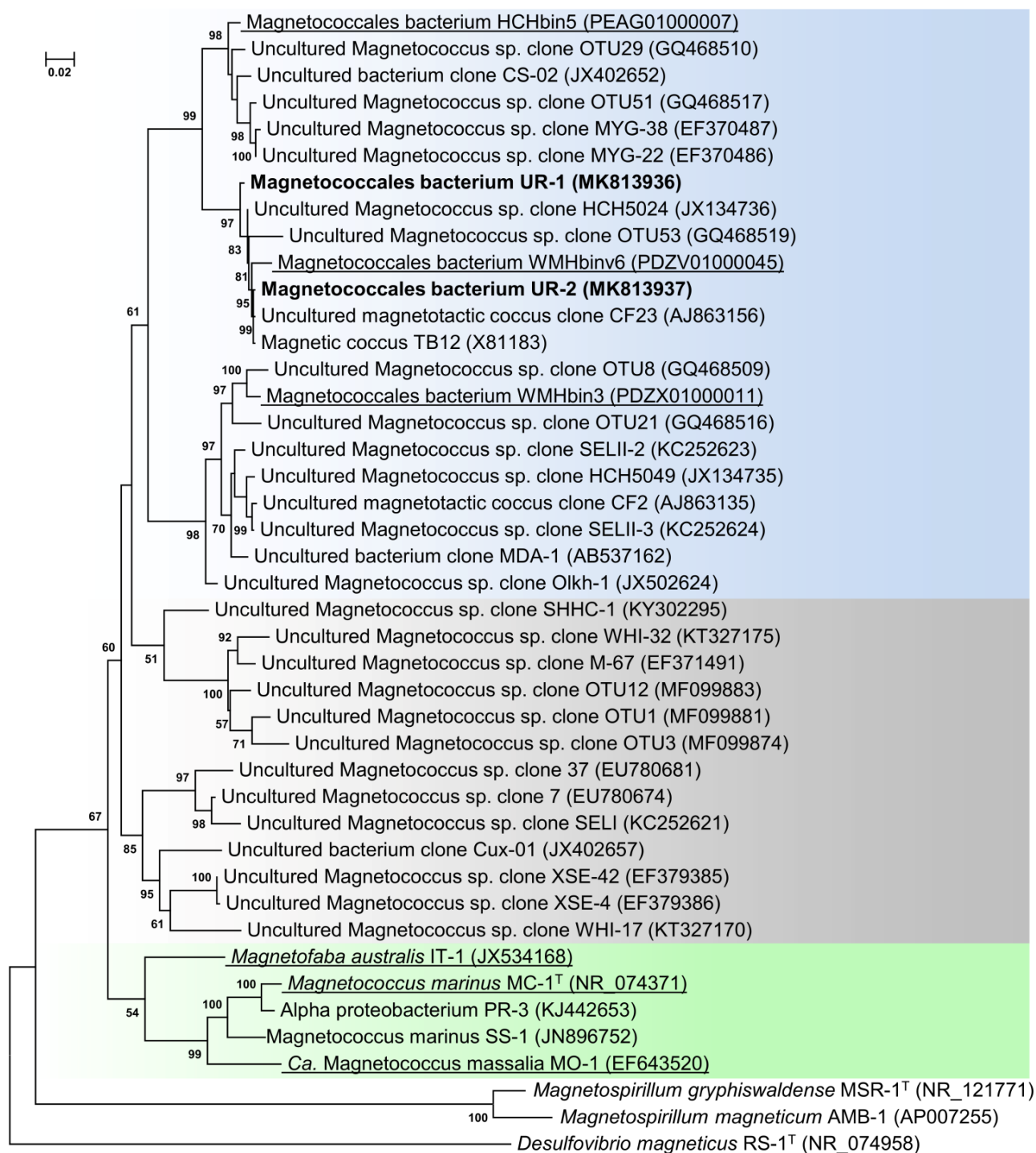


Рисунок 11. Филогенетическое дерево, построенное на основе последовательностей гена 16S рРНК (1277 п.о.). Алгоритм maximum-likelihood, эволюционная модель GTR+F+I+G4. Жирным шрифтом выделены ОТЕ UR-1 и ОТЕ UR-2. Подчеркиванием обозначены бактерии, у которых известен геном. Шкала, 0.01 замена на нуклеотидную позицию.

Для построения филогенетического дерева также были использованы доступные последовательности гена 16S рРНК из геномов пресноводных

кокков HCHbin5, WMHbin6 и WMHbin3. Уровень сходства UR-1 с WMHbin6, HCHbin5 и WMHbin3 составил 98.2%, 96.2% и 93.1%, соответственно. Согласно предложенным стандартам для описания некультивируемых бактерий, уровень сходства последовательностей 16S рРНК 95-98.6% говорит о принадлежности к одному роду, а уровень сходства 92-95% - о принадлежности к одному семейству (Konstantinidis, Rosselló-Móra, Amann, 2017). Таким образом, UR-1, HCHbin5, WMHbin6 и WMHbin3 потенциально принадлежат к одному семейству, внутри которого UR-1, WMHbin6 и HCHbin5, возможно, образуют один и тот же род, а WMHbin3 потенциально является представителем другого рода.

На филогенетическом дереве ОТЕ UR-1 формировала кластер с последовательностями гена 16S рРНК HCH5024, CF23 и TB12, которые ранее были получены из природных образцов Германии и Китая. Уровень сходства между ними составлял 99%, что указывает на их возможную принадлежность к разным штаммам одного и того же вида или к разным близкородственным видам. Кроме того, последовательности гена 16S рРНК, принадлежащие HCHbin5 и WMHbin3, группировались с последовательностями бактерий, обнаруженных в реках и озерах Германии, Китая и европейской части России, что указывает на широкое распространение в пресных водоемах представителей потенциального семейства, в которое входит ОТЕ UR-1.

8.2. Детекция представителей ОТЕ UR-1 в сообществе реки Уда.

Для идентификации морфологии клеток и магнетосом доминирующей ОТЕ UR-1 был сконструирован специфичный зонд Uda54-3, который имел более трех несовпадений с последовательностями ОТЕ UR-2.

FISH, проведенная на сепарированных из микрокосма «Уда» клетках МТБ, показала, что специфичный для ОТЕ UR-1 зонд Uda54-3, меченный $Cy3$, гибридизовался с кокковидной клеткой (Рис. 12А, 12Б). Клетка также гибридизовалась с универсальными на бактерий зондами EUB338 (Рис. 12В) и окрашивалась ДАФИ (Рис. 12Г).

ПЭМ изображения той же клетки, идентифицированной зондом Uda54-3, представлены на рисунках 12Е-12Ж. Идентифицированная клетка имела удлинённые магнетосомы (Рис. 12З), не организованные в цепочки и сгруппированные на одной стороне клетки (Рис. 12Д, Ж).

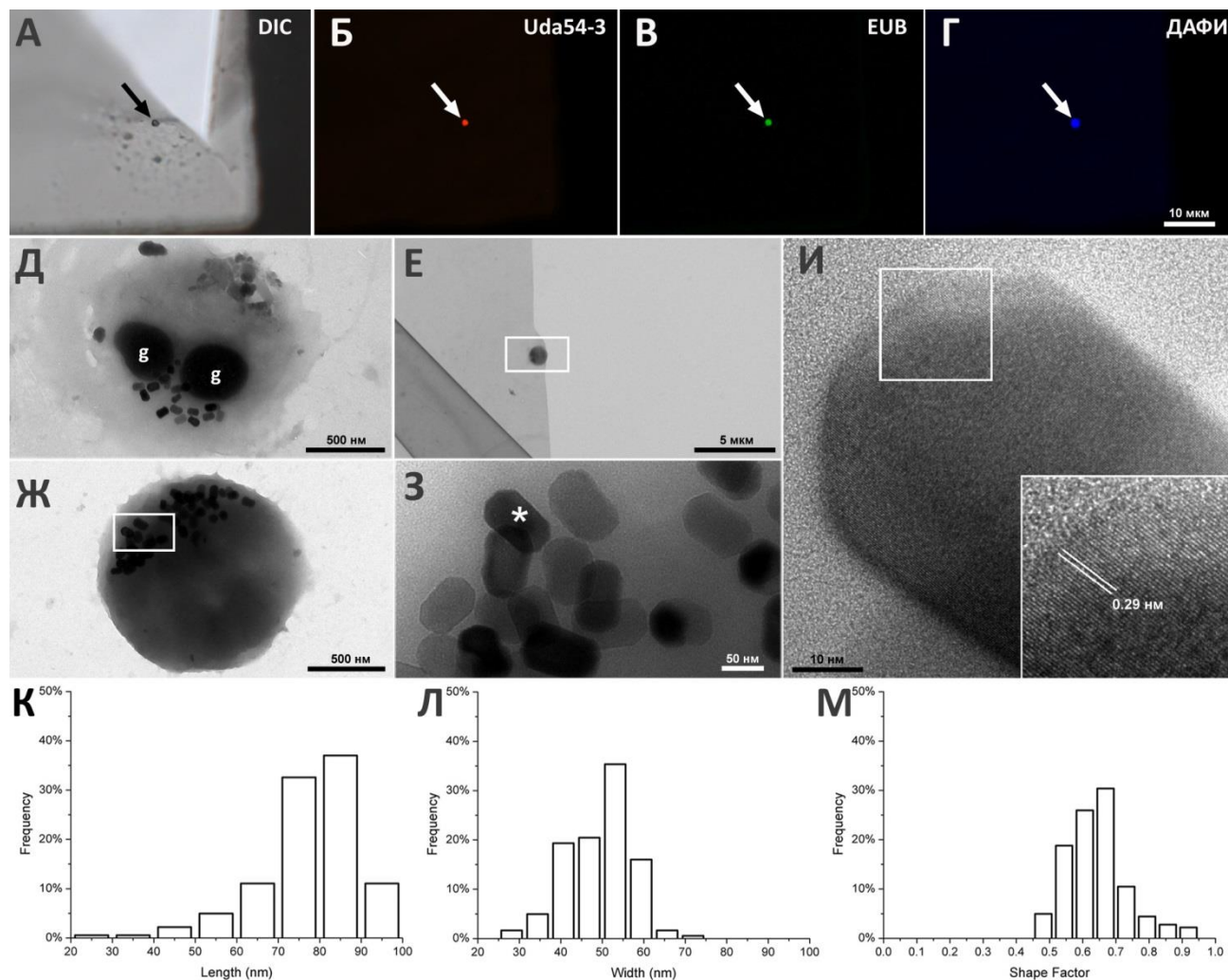


Рисунок 12. Анализ морфологии клеток ОТЕ UR-1 и его магнетосом. А) ДИК-микроскопия, стрелкой указана круглая клетка. Б) Флуоресцентная микроскопия того же поля, изображенного на А; показана гибридизация круглых клеток с зондом UR54-3 (стрелка). В) Флуоресцентная микроскопия с зондами EUV (стрелка). Г) Флуоресцентная микроскопия того же поля, показывающая круглую клетку, окрашенную ДАФИ (стрелка). Д) ПЭМ-изображение клетки UR-1, клетка содержит два электронно-плотных включения. Е) ПЭМ-изображение кокка, показанного на изображении А. Ж) Увеличенное изображение области, выделенной прямоугольником на рисунке Е. Показаны магнетосомы не организованные в цепочки и сгруппированные на одной стороне клетки. З) Увеличенное изображение области, выделенной прямоугольником на рисунке Ж. Показана удлинённая форма магнетосом с плоскими углами. И) ПЭМ ВР-изображение магнетосомы, отмеченной звездочкой на изображении З. На вставке показано межплоскостное расстояние между атомами, равное 0.29 нм, что указывает на то, что кристалл состоит из магнетита. К) Частотное распределение длин кристаллов магнетосом. Л) Частотное распределение ширины кристаллов магнетосом. М) Частотное распределение значений коэффициента формы (ширина/длина).

ПЭМ ВР магнетосом показала, что кристаллы имеют межплоскостное расстояние между атомами равное 0.29 нм, что соответствует магнетиту (Рис. 13И) (Martínez-Mera et al., 2007; Zhuang et al., 2015). Штамм UR-1 имел среднюю длину магнетосом 77.4 ± 11.9 нм ($n=181$); более 90% магнетосом имели длину от 65 до 95 нм (Рис. 13К). Средняя ширина магнетосом – 46.2 ± 7.9 нм; Более чем 90% магнетосом имели ширину от 40.6 до 59.3 нм (Рис. 13Л) и средний коэффициент формы 0.64 (Рис. 13М). В цитоплазме некоторых клеток UR-1 были обнаружены электронно-плотные включения (Рис. 13Д). Подобные структуры, были охарактеризованы ранее в исследованиях и коррелируют с полифосфатными (поли-Р) включениями (Keim et al., 2005; Lins, Farina, 1999).

Как показали результаты, зонд Uda54-3 не гибридизовался с клетками других типов (Рис. 13).

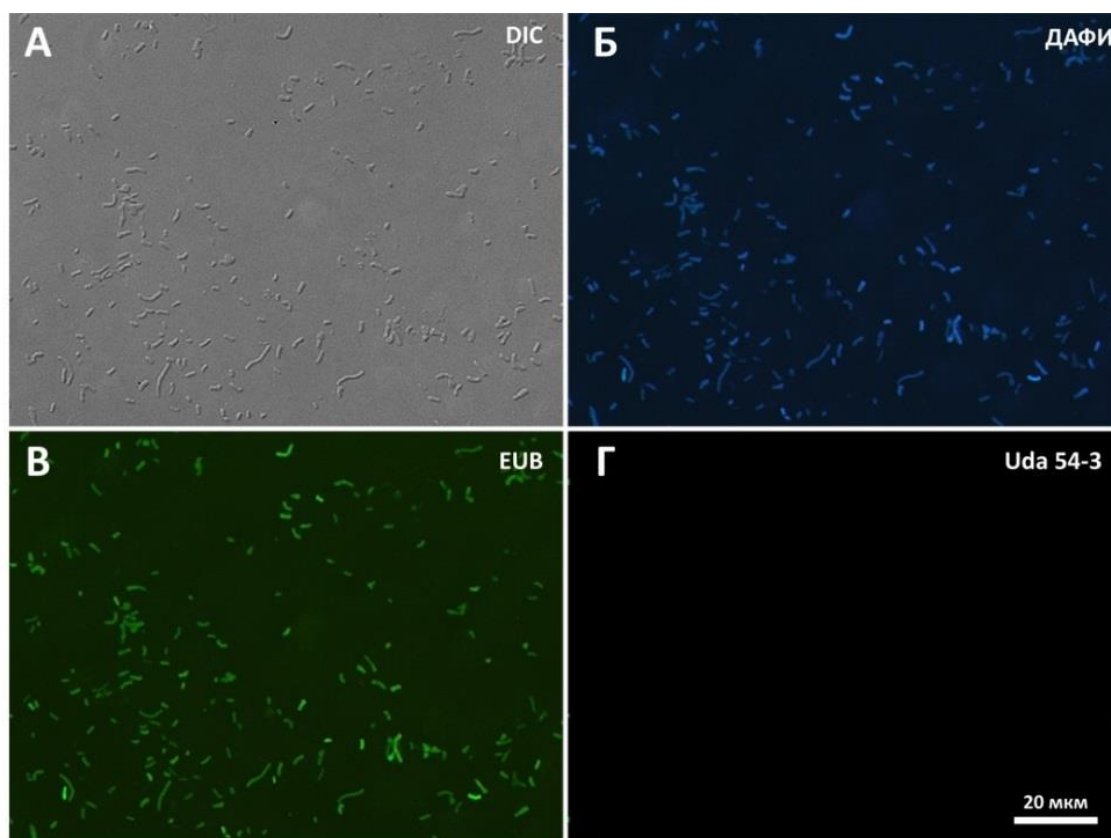


Рисунок 13. Контроль специфичности зонда Uda 54-3. А) ДИК изображение культуры *E.coli*. Б) Клетки *E.coli*, окрашенные ДАФИ. В) Клетки *E. coli*, распознаваемые зондами EUB. Г) Клетки *E.coli*, не распознаваемые зондом Uda54-3, что указывает на его специфичность в используемых условиях гибридизации.

8.3. Данные о геноме кокка UR-1.

Была секвенирована ДНК сепарированных клеток МТБ из микрокосма «Уда». В результате сборки и бининга данных был получен геном магнитотактического кокка UR-1. Он состоял из 546 контигов размером 4,143,644 п.о. G+C состав – 52.2%. В соответствии со стандартами, предъявляемым к метагеномным сборкам, геном UR-1 имел высокое качество (полнота сборки 97.4%, контаминация 3.8%). Последовательность генома была депонирована в GenBank под номером RXIU000000000. Общие данные о геноме кокка UR-1 и геномах других представителей порядка *Magnetococcales* суммированы в Таблице 5. В собранном геноме, в контиге размером 25034 п.о., была выявлена последовательность 16S рРНК, которая была идентична последовательности доминирующей ОТЕ UR-1. Стоит отметить, что последовательность зонда Uda54-3 была идентична участку 16S рРНК, полученной из генома, что позволяет ассоциировать геном и описанный в пункте 8.2 фенотип.

Таблица 5 - Данные о геномах МТБ, принадлежащих порядку *Magnetococcales*

Штамм	CheckM полнота сборки, %	CheckM контаминация, %	G+C состав, %	Размер генома, п.о.	Номер в GenBank	ссылка
UR-1	97.4	3.8	52.2	4,143,644	RXIU000000000	-
YD0425bin7	96.4	1.7	55.7	3,583,729	PDZU000000000	(Lin et al., 2018)
WMHbinv6	95.8	2.5	55.3	3,839,927	PDZV000000000	(Lin et al., 2018)
HCHbin5	99.0	4.7	57.0	4,188,618	PEAG000000000	(Lin et al., 2018)
WMHbin3	93.5	2.1	61.6	4,601,373	PDZX000000000	(Lin et al., 2018)
ER1bin7	99.1	1.7	52.3	3,866,744	PEAM000000000	(Lin et al., 2018)
HA3dbin1	96.6	3.4	53.3	4,326,896	PEAK000000000	(Lin et al., 2018)
HAa3bin1	98.3	4.2	53.2	4,347,394	PEAI000000000	(Lin et al., 2018)
DCbin2	77.3	1.7	51.9	3,364,396	PEAO000000000	(Lin et al., 2018)
DCbin4	94.1	2.1	54.3	4,521,331	PEAN000000000	(Lin et al., 2018)
WMHbin1	98.3	2.9	54.3	4,380,192	PDZY000000000	(Lin et al., 2018)
<i>Magnetofaba australis</i> IT-1	98.3	0.8	54.2	4,719,581	NC_008576	(Araujo et al., 2016)
<i>Magnetococcus marinus</i> MC-1	98.3	0.0	55.2	5,043,095	LO017727	(Schübbe et al., 2009)
'Ca. Magnetococcus massalia' MO-1	98.7	0.8	61.3	4,986,701	LVJN000000000	(Ji et al., 2017)
HA3dbin3	74.4	2.5	61.7	2,895,658	PEAJ000000000	(Lin et al., 2018)
DC0425bin3	98.3	1.7	65.4	3,696,616	PEAP000000000	(Lin et al., 2018)

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

Для разделения таксонов требуется установление допустимых критериев, которые должны учитывать филогению, основанную на геномной последовательности, в качестве основного инструмента. Клады должны (1) быть монофилетичными (Rossello-Mora, Amann, 2001) и (2) приводить к наименьшему количеству изменений по сравнению с текущей таксономией (Orata et al., 2018). Для определения филогенетического положения полученного генома UR-1 было сконструировано дерево на основе аминокислотных последовательностей 120 конкатенированных белков корового генома доступных представителей порядка *Magnetococcales* (Рис. 14). На филогеномном дереве штаммы порядка *Magnetococcales* формировали 5 клад, которые были поддержаны высокими значениями «bootstrap» (100%).

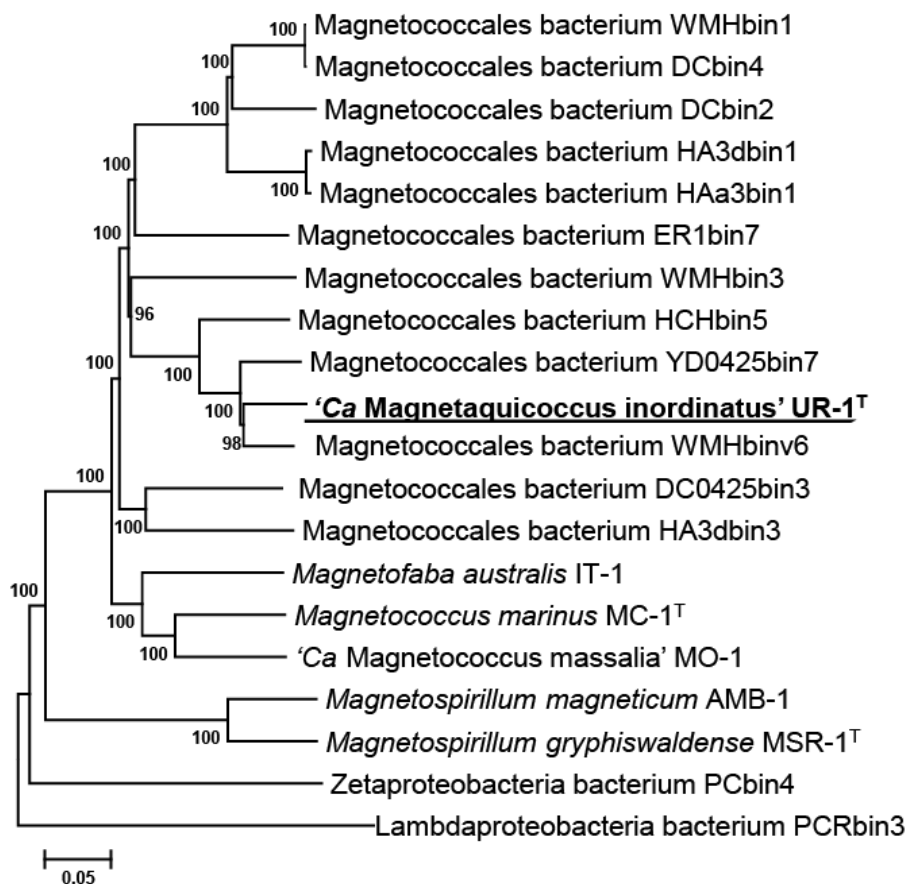


Рисунок 14. Дендрограмма 120 конкатенированных однокопийных белков *Magnetococcales*. Показано филогенетическое положение штамма UR-1. Дерево построено с помощью алгоритма maximum-likelihood с применением модели LG+F+I+G4. Шкала, 0.05 замен на аминокислотную позицию.

Культивируемые морские штаммы МО-1, IT-1 и MC-1^T семейства *Magnetococcaceae*, также как и на дереве генов 16S рРНК формировали отдельную ветвь. UR-1 формировал кладу вместе с WMHbin6, YD0425bin7, HCHbin5 и WMHbin3, что коррелировало с результатами анализа гена 16S рРНК. Третью группу составляли 5 геномов: DC0425bin3, WMHbin1, DCbin4, HAA3bin1, HA3dbin1 и DCbin2. Отдельную от всех ветвь формировал ER1bin7. И, наконец, в пятую группу входили геномы DC0425bin3 и HA3dbin3. Выявленные 5 клад, возможно, представляют пять семейств внутри порядка *Magnetococcales*. Они были предварительно обозначены как «*Magnetococcaceae*», «UR-1», «WMHbin1», «ER1bin7» и «DC0425bin3» соответственно. Такое же разделение на семейства было ранее предложено в Genome Taxonomy Database (GTDB), за исключением «ER1bin7» (Parks et al., 2018). Для подтверждения обозначенных семейств были проведены дополнительные исследования доступных геномов представителей порядка *Magnetococcales*.

Для разделения таксонов на уровне семейства и рода используют численные индексы, основанные на аминокислотной последовательности генома: индексы AAI и РОСР. Анализ AAI показал, что значения идентичности между представителями порядка *Magnetococcales* находились в пределах от 50.1% до 99.0% (Рис. 15). Значения AAI между представителями выявленных филогенетических ветвей находились в пределах 50.1%-55.8%. Рекомендуемые значения AAI составляют 45%-65% для представителей одно и того же семейства и 65%-95% для представителей одного и того же рода (Konstantinidis, Rosselló-Móra, Amann, 2017). Однако, согласно исследованиям, AAI не имеет четких границ для разделения таксонов высоких рангов (Konstantinidis, Tiedje, 2005; Luo, Rodriguez-R, Konstantinidis, 2014) и рекомендуемые значения могут быть скорректированы при необходимости (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).

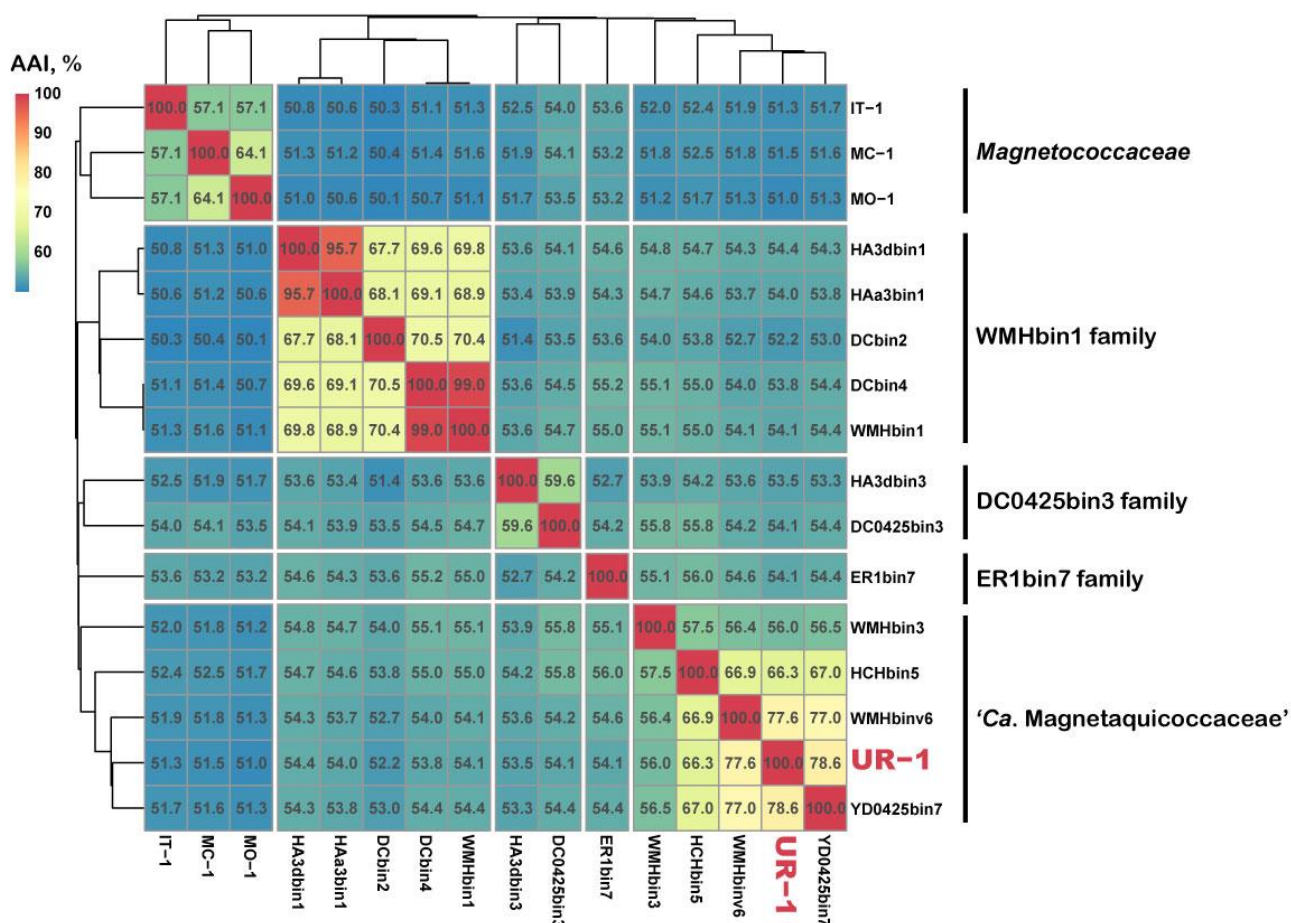


Рисунок 15. Значения AAI между представителями порядка *Magnetococcales*. Тепловая карта показывает попарные сравнения AAI между геномами магнитных кокков. Тепловая цветовая гамма расположена в левом верхнем углу. Линиями разграничены предполагаемые семейства. Черные линии, расположенные справа, указывают предполагаемое название семейства.

Применение нижней границы в 45% и 50% привело бы к объединению абсолютно всех представителей порядка *Magnetococcales* в одно семейство. Применение значений 55-56% для разделения семейств коррелировало с порядком ветвления филогеномного дерева и подтверждало возможность выделения 5 семейств в составе порядка *Magnetococcales*. При применении нижней границы в 65% для разделения родов культивируемые представители рода *Magnetococcus*, MC-1^T и MO-1, расходились бы в разные рода. При установлении границы разграничения близких родов в 64% приведет к подтверждению разделения родов '*Magnetofaba*' и *Magnetococcus*. В результате, при применении значения AAI, равное 64%, в качестве границы разделения

родов, в составе клады «UR-1» было выделено 2 рода: в первый входили UR-1, YD0425bin7, WMHbin6 и HCHbin5, второй род образовывал кокк WMHbin3. Внутри клады «WMHbin1» все представители образовывали единственный род, а в кладе «DC0425bin3» выделялись 2 рода. Предлагаемые диапазоны AAI в дальнейшем могут быть применены для анализа геномов класса ‘*Campylobacterota*’, полученных из чистых культур или метагеномных данных, что обеспечит последовательную и надежную классификацию новых представителей на уровне рода и семейства.

Еще одним инструментом дифференциации родов является РОСР, для которого была предложена граница разделения, равная 50% консервативных белков (Qin et al., 2014). Анализ полученных данных показал, что значения РОСР между всеми представителями порядка *Magnetococcales* находились в пределах от 32.9% до 90.3% (Таблица 6). Интересно, что значения РОСР между представителями двух родов ‘*Magnetofaba*’ и *Magnetococcus* составили 53.0-57.0%, что выше предлагаемого порога разделения родов равного 50% (Qin et al., 2014). В целом, значения РОСР поддерживали результаты расчета AAI, однако несколько анализируемых штаммов имеют низкие значения полноты генома, что сильно влияет на конечный результат расчета РОСР и, таким образом, может привести к недостоверным результатам. Таким образом, порог в 50% РОСР не является применимым инструментом для разделения родов внутри порядка *Magnetococcales*. Такая же ситуация была показана ранее при разделении родов, например, в составе семейств *Methylococcaceae* (Orata et al., 2018) и *Neisseriaceae* (Li et al., 2017b).

Таблица 6 - Значения РОСР между МТБ порядка *Magnetococcales*. * полнота генома <70%. Черные границы указывают кластеры на филогеномном дереве. Красные границы объединяют представителей одного рода

	UR-1	YD042 5bin7	WMHb in6	HCHbi n5	WMHb in3	ER1bin 7	HA3dbi n1	HAa3bi n1	DCbin2 *	DCbin4	WMHb in1	IT-1	MC-1	MO-1	HA3dbi n3*	DC042 5bin3
UR-1	100.0	69.7	75.4	57.7	49.6	46.2	46.3	46.5	39.5	44.8	46.2	38.6	42.2	38.0	40.9	45.2
YD042 5bin7	69.7	100.0	70.7	57.8	49.4	44.7	44.4	44.8	39.3	44.3	45.1	37.4	41.6	36.6	38.8	43.5
WMHb inv6	75.4	70.7	100.0	61.6	51.7	48.5	47.1	47.2	40.1	45.8	46.7	39.5	43.1	38.0	41.8	46.0
HCHbi n5	57.7	57.8	61.6	100.0	48.4	46.4	42.1	43.7	37.4	42.4	43.8	38.0	40.9	36.6	36.7	41.5
WMHb in3	49.6	49.4	51.7	48.4	100.0	47.1	48.3	49.1	42.5	47.7	49.3	39.3	41.1	37.5	40.3	47.2
ER1bin 7	46.2	44.7	48.5	46.4	47.1	100.0	46.8	47.3	40.5	47.2	48.6	46.7	48.9	46.0	38.5	45.7
HA3dbi n1	46.3	44.4	47.1	42.1	48.3	46.8	100.0	84.1	57.2	68.4	68.8	37.2	39.8	37.0	41.4	47.4
HAa3bi n1	46.5	44.8	47.2	43.7	49.1	47.3	84.1	100.0	60.5	69.5	69.8	37.7	40.4	37.9	42.4	48.1
DCbin2 *	39.5	39.3	40.1	37.4	42.5	40.5	57.2	60.5	100.0	59.1	59.7	32.9	35.4	32.9	35.4	41.7
DCbin4	44.8	44.3	45.8	42.4	47.7	47.2	68.4	69.5	59.1	100.0	90.3	38.5	41.4	38.1	40.2	48.2
WMHb in1	46.2	45.1	46.7	43.8	49.3	48.6	68.8	69.8	59.7	90.3	100.0	39.4	42.3	39.3	41.1	49.3
IT-1	38.6	37.4	39.5	38.0	39.3	46.7	37.2	37.7	32.9	38.5	39.4	100.0	57.5	52.4	35.9	45.0
MC-1	42.2	41.6	43.1	40.9	41.1	48.9	39.8	40.4	35.4	41.4	42.3	57.5	100.0	65.6	37.5	48.1
MO-1	38.0	36.6	38.0	36.6	37.5	46.0	37.0	37.9	32.9	38.1	39.3	52.4	65.6	100.0	34.4	42.7
HA3dbi n3*	40.9	38.8	41.8	36.7	40.3	38.5	41.4	42.4	35.4	40.2	41.1	35.9	37.5	34.4	100.0	48.6
DC042 5bin3	45.2	43.5	46.0	41.5	47.2	45.7	47.4	48.1	41.7	48.2	49.3	45.0	48.1	42.7	48.6	100.0

Для разделения штаммов на уровне вида используют основанные на нуклеотидной последовательности индексы ANI и dDDH. Анализ полученных данных показал, что значения ANI между МТБ порядка *Magnetococcales* находились в пределах от 70.0% до 99.4% (Таблица 7). Значения ANI для кокка UR-1 находились ниже стандартного порога разделения видов (<95-96%) со всеми анализируемыми последовательностями, что говорит о его принадлежности к отдельному виду (Goris et al., 2007). Рассчитанные значения dDDH находились в пределах от 15.1% до 93.3% (Таблица 8). Значения dDDH для кокка UR-1 были ниже стандартного порога разделения видов (<70%) со всеми анализируемыми последовательностями, что подтверждало результаты ANI (Auch et al., 2010). Согласно результатам анализа ANI и dDDH, внутри клады «WMHbin1», штаммы DCbin4 и WMHbin1 представляли один и тот же вид в составе одного и того же семейства. В же время значение ANI между штаммами HА3bin1 и HАa3bin1 (95.3%) находилось на границе разделения видов (95-96%), что не позволило с уверенностью отнести их к разным видам.

Таким образом, на основании анализа последовательностей доступных геномов, было предложено выделить в порядке *Magnetococcales* пять семейств. Также штамм UR-1 был определен как новый вид-кандидат, которому было предложено название '*Ca. Magnetaquicoccus inordinatus*'. Семейству-кандидату, к которому принадлежал UR-1, было предложено название '*Ca. Magnetaquicoccaceae*', в составе него был выделен род-кандидат '*Ca. Magnetaquicoccus*'.

Таблица 7 - Значения ANI между МТБ порядка *Magnetococcales*. HP – нерелевантные значения <70%. Черные границы указывают кластеры на филогеномном дереве. Красные границы объединяют представителей одного вида

	UR-1	YD042 5bin7	WMHb inv6	HCHbi n5	WMHb in3	ER1bin 7	HA3dbi n1	HAa3bi n1	DCbin2	DCbin4	WMHb in1	IT-1	MC-1 ^T	MO-1	HA3dbi n3	DC042 5bin3
UR-1	100.0	79.1	79.9	77.2	73.8	72.1	HP*	73.7	HP	HP	HP	HP	74.4	HP	HP	HP
YD042 5bin7	79.1	100.0	78.6	77.6	73.7	71.3	72.5	72.8	73.5	72.4	72.0	HP	HP	HP	73.1	73.5
WMHb inv6	79.9	78.6	100.0	77.0	73.2	71.9	HP	HP	HP	72.0	71.8	HP	HP	HP	HP	73.2
HCHbi n5	77.2	77.6	77.0	100.0	75.4	71.7	74.6	74.2	73.0	77.1	74.6	74.9	77.3	74.8	73.2	75.9
WMHb in3	73.8	73.7	73.2	75.4	100.0	72.1	73.8	73.0	77.6	82.0	73.3	75.2	76.6	74.6	75.1	75.6
ER1bin 7	72.1	71.3	71.9	71.7	72.1	100.0	HP	HP	HP	71.4	HP	73.2	71.9	72.7	HP	71.5
HA3dbi n1	N/A	72.5	HP	74.6	73.8	HP	100.0	95.3	76.1	77.1	76.9	HP	HP	HP	HP	73.2
HAa3bi n1	73.7	72.8	HP	74.2	73.0	HP	95.3	100.0	76.1	77.2	77.3	HP	HP	HP	74.2	72.3
DCbin2	HP	73.5	HP	73.0	77.6	HP	76.1	76.1	100.0	77.7	78.4	HP	HP	HP	HP	HP
DCbin4	HP	72.4	72.0	77.1	82.0	71.4	77.1	77.2	77.7	100.0	99.4	72.8	HP	HP	73.1	73.6
WMHb in1	HP	72.0	71.8	74.6	73.3	HP	76.9	77.3	78.4	99.4	100.0	72.4	HP	HP	73.7	74.1
IT-1	HP	HP	HP	74.9	75.2	73.2	HP	HP	HP	72.8	72.4	100.0	76.0	75.4	73.9	74.4
MC-1 ^T	74.4	HP	HP	77.3	76.6	71.9	HP	HP	HP	HP	HP	76.0	100.0	77.2	HP	72.4
MO-1	HP	HP	HP	74.8	74.6	72.7	HP	HP	HP	HP	HP	75.4	77.2	100.0	HP	72.4
HA3dbi n3	HP	73.1	HP	73.2	75.1	HP	HP	74.2	HP	73.1	73.7	73.9	HP	HP	100.0	77.3
DC042 5bin3	HP	73.5	73.2	75.9	75.6	71.5	73.2	72.3	HP	73.6	74.1	74.4	72.4	72.4	77.3	100.0

Таблица 8 - Значения dDDH между МТБ порядка *Magnetococcales*. Черные границы указывают кластеры на филогеномном дереве. Красные границы объединяют представителей одного вида

	UR-1	YD042 5bin7	WMHb inv6	HCHbi n5	WMHb in3	ER1bin 7	HA3dbi n1	HAa3bi n1	DCbin2	DCbin4	WMHb in1	IT-1	MC-1 ^T	MO-1	HA3dbi n3	DC042 5bin3
UR-1	100	21.6	21.3	19.8	20.2	17.0	18.9	20.0	18.7	16.9	17.7	23.6	22.6	21.5	20.9	19.0
YD042 5bin7	21.6	100	20.3	19.8	15.7	16.8	16.6	16.8	18.3	17.1	16.8	15.1	20.1	16.3	16.8	15.7
WMHb inv6	21.3	20.3	100	20.2	18.0	18.1	17.9	18.1	16.4	18.5	19.0	18.3	23.8	21.1	16.3	17.0
HCHbi n5	19.8	19.8	20.2	100	19.6	19.3	17.0	17.1	17.2	19.3	17.8	22.6	20.5	23.0	18.2	18.7
WMHb in3	20.2	15.7	18.0	19.6	100	17.2	17.9	17.9	20.2	24.2	17.8	17.8	20	18.8	18.4	18.3
ER1bin 7	17.0	16.8	18.1	19.3	17.2	100	16.2	15.4	15.8	15.7	16.0	17.0	18.1	15.8	17.6	18.0
HA3dbi n1	18.9	16.6	17.9	17.0	17.9	16.2	100	62.6	19.4	20.1	20.0	17.7	16.2	17.2	19.1	16.0
HAa3bi n1	20.0	16.8	18.1	17.1	17.9	15.4	62.6	100	19.5	20.0	20.0	17.7	16.7	16.9	23.8	15.8
DCbin2	18.7	18.3	16.4	17.2	20.2	15.8	19.4	19.5	100	21.5	22.0	20.6	17.0	19.5	18.6	19.4
DCbin4	16.9	17.1	18.5	19.3	24.2	15.7	20.1	20.0	21.5	100	93.3	15.2	22.4	33.0	17.5	17.8
WMHb in1	17.7	16.8	19.0	17.8	17.8	16.0	20.0	20.0	22.0	93.3	100	15.4	21	27.9	18.0	18.2
IT-1	23.6	15.1	18.3	22.6	17.8	17.0	17.7	17.7	20.6	15.2	15.4	100	20.2	18.5	18.3	17.5
MC-1 ^T	22.6	20.1	23.8	20.5	20.0	18.1	16.2	16.7	17.0	22.4	21.0	20.2	100	22.2	16.0	18.6
MO-1	21.5	16.3	21.1	23.0	18.8	15.8	17.2	16.9	19.5	33.0	27.9	18.5	22.2	100	16.8	17.5
HA3dbi n3	20.9	16.8	16.3	18.2	18.4	17.6	19.1	23.8	18.6	17.5	18.0	18.3	16.0	16.8	100	18.8
DC042 5bin3	19.0	15.7	17.0	18.7	18.3	18.0	16.0	15.8	19.4	17.8	18.2	17.5	18.6	17.5	18.8	100

8.5. Анализ генома штамма UR-1.

8.5.1. Гены биоминерализации магнетосом.

Благодаря тому, что геном UR-1 имел высокую полноту сборки, мы смогли в нем обнаружить практически полный магнетосомный геномный остров (МГО) (Таблица 9). Большинство генов синтеза магнетосом было обнаружено в контиге RXIU01000008, который имел размер 44,671 п.о. Этот контиг содержал 42 гена, 17 из которых имели высокий уровень сходства с *tam* и *mms* генами представителей *Magnetococcaceae* и магнитотактических *Alphaproteobacteria* (Таблица A1, A2). Также был обнаружен второй ген *tamK*, который находился в контиге RXIU01000185 размером 7100 п.о. Кластер *tamAB* содержал гены *tamK*, *tamF*-like, *tamL*, *tamM*, *tamN*, *tamO*, *tamP*, *tamA*, *tamQ*, *tamB*, *tamS*, *tamT* (Рис. 16). Также был обнаружен кластер *tamHIE* и гены *mmsF*-like и *tamD*-like, расположенные выше *tamAB* кластера. Интересной особенностью было то, что *MmsF*-like и *MamD*-like имели высокий уровень сходства с соответствующими генами у '*Ca. Terasakiella magnetica*' и *Ms. caucaseum* SO-1^T соответственно (Grouzdev et al., 2014; Monteil et al., 2018). Между кластерами *tamAB* и *tamHIE* был обнаружен ген, кодирующий белок с неопределенной функцией и не имеющий гомологии ни с одним из белков в базе GenBank. В конце контига, в котором находился МГО, был обнаружен неполный ген, имеющий высокую гомологию с *feoA1*. Расположение этой части гена было сходно с таковым у пресноводного кокка WMHbin6, имеющего гены *feoAB1* в 7.5 т.п.о. выше МГО. Также в контиге RXIU01000148 был обнаружен неполный ген *feoB1*, рядом с которым располагался ген, имеющий высокий уровень сходства с *tamB*.

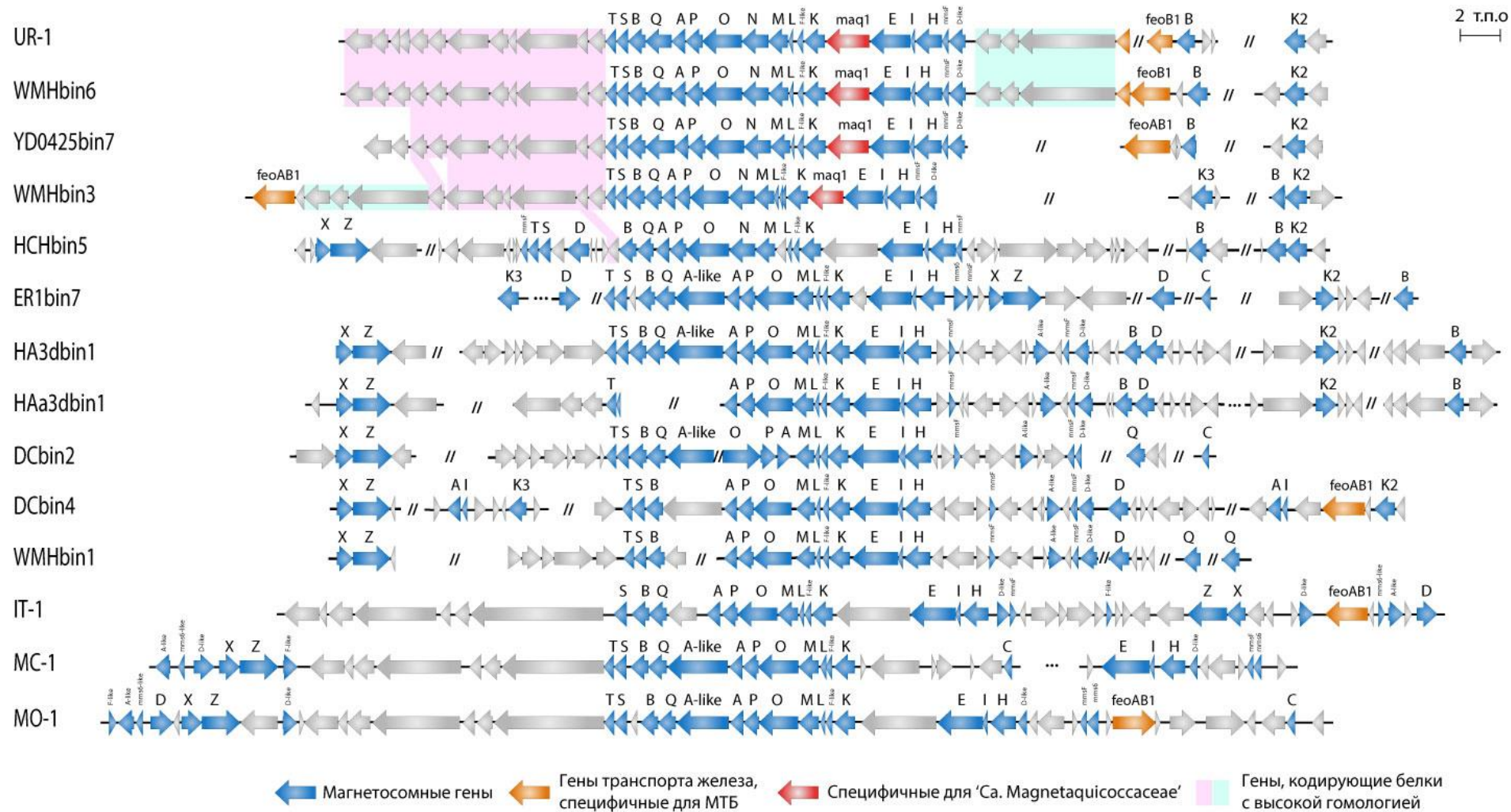


Рисунок 16. Организация генов биоминерализации магнетосом у МТБ порядка *Magnetococcales*.

Таблица 9 – Список белков региона МГО у штамма UR-1. * не определен

Белок	COG	pfam	Номер белка	Локус гена
HP	COG0642	pfam00512	WP_130470090	EJP87_RS01475
HP	COG0426	pfam00753	WP_130470091	EJP87_RS01480
HP	COG0790	pfam08238	WP_130470092	EJP87_RS01485
HP	COG0790	-*	WP_130470093	EJP87_RS01490
HP	-	pfam13682	WP_130470094	EJP87_RS01495
HP	COG0784	pfam01814	WP_130470095	EJP87_RS01500
HP	COG5271	cl25522	WP_130470096	EJP87_RS01505
HP	COG1366	-	WP_130470097	EJP87_RS01510
HP	COG0784	pfam00072	WP_130470098	EJP87_RS01515
HP	COG0642/COG2202 /COG2198	pfam00512/pfam13426 /pfam01627	WP_130470099	EJP87_RS01520
HP	-	-	WP_130470100	EJP87_RS01525
HP	-	-	WP_130470101	EJP87_RS01530
MamT	-	-	WP_130470102	EJP87_RS01535
MamS	-	-	WP_130470103	EJP87_RS01540
MamB	COG1230	pfam01545	WP_130470104	EJP87_RS01545
MamQ	cl00742	pfam04011	WP_130470105	EJP87_RS01550
MamA	COG0457	pfam13432	WP_130470106	EJP87_RS01555
MamP	-	cl19867	WP_130470107	EJP87_RS01560
MamO	COG0730/COG0265	pfam01925/pfam13365	WP_130470108	EJP87_RS01565
MamN	cl30430	pfam03600	WP_130470109	EJP87_RS01570
MamM	COG1230	pfam01545	WP_130470110	EJP87_RS01575
MamL	-	pfam06305	WP_130470111	EJP87_RS01580
MamF-like	cl21616	cl21616	WP_130470112	EJP87_RS01585
MamK	COG1077	pfam06723	WP_130470113	EJP87_RS01590
HP	-	-	WP_130470114	EJP87_RS01595
MamE	COG0265	pfam00089/pfam13180	WP_130470115	EJP87_RS01600
MamI		-	WP_130470116	EJP87_RS01605
MamH	COG0477	pfam07690	WP_130470117	EJP87_RS01610
MmsF	cl21616	-	WP_130470118	EJP87_RS01615
MamD-like	-	-	WP_130470119	EJP87_RS01620
HP	-	cl21410	WP_130470120	EJP87_RS01625
HP	COG1360	-	WP_130470121	EJP87_RS01630
HP	COG1322/COG1463	pfam01442	WP_130470122	EJP87_RS01635
FeoA	cl00838	pfam04023	WP_130470123	EJP87_RS01640
MamB	COG1230	pfam01545	WP_130471889	EJP87_RS10830
FeoB	COG0370	pfam02421	WP_130471890	EJP87_RS10835
MamK	COG1077	cl29669	WP_130472155	EJP87_RS12205

Последующий филогенетический анализ показал, что дерево конкатенированных аминокислотных последовательностей магнетосомных белков было неколлинеарно дереву, построенному на основании коровых

белков. На филогенетическом дереве магнетосомных белков UR-1 кластеризовался вместе с WMHbin6, UD0425bin7 и WMHbin3 (Рис. 17), однако клада являлась внешней по отношению к ветвям, образованными другими штаммами. Кроме этого конкатенат, принадлежащий HCHbin5, образовывал отдельную от всех ветвь, а не кластеризовался с представителями своего рода. Несоответствие положений ветвей указывает на горизонтальный перенос магнетосомных генов, произошедший у семейства '*Ca. Magnetaquicoccaceae*' и, в особенности, у штамма HCHbin5.

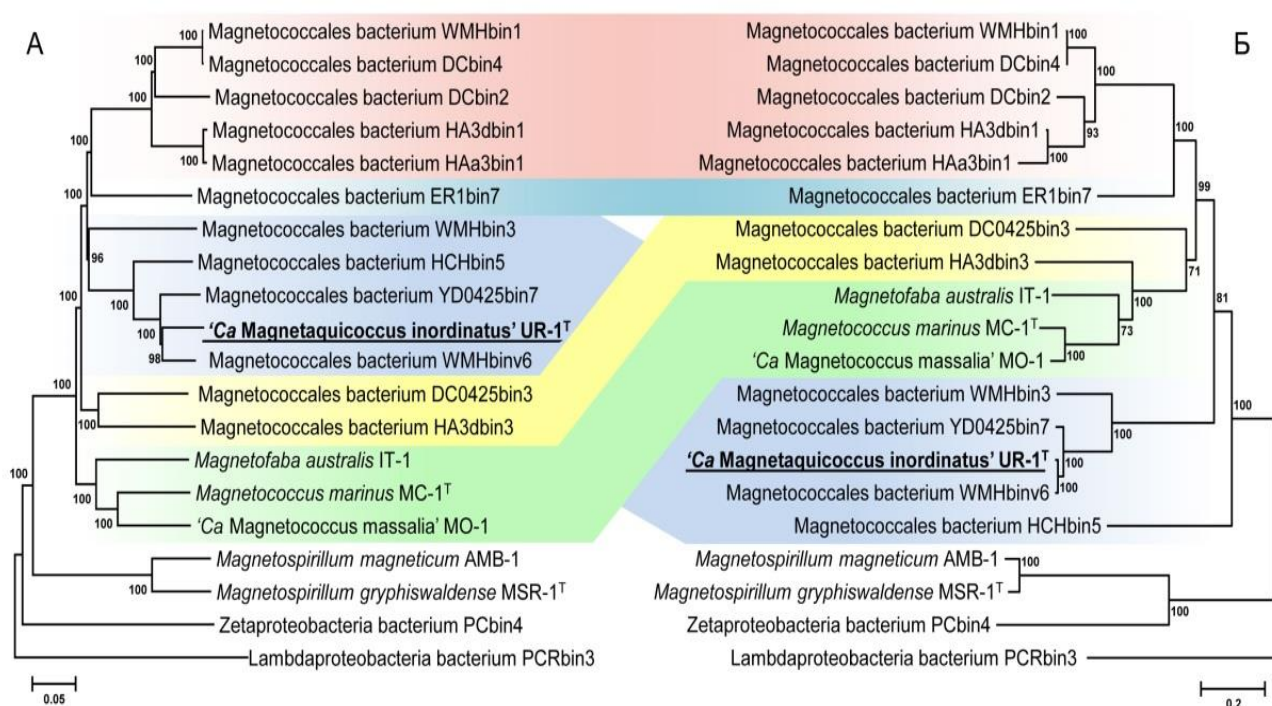


Рисунок 17. Сравнение филогенетических деревьев, построенных на основе (А) 120 конкатенированных однокопийных белков *Magnetococcales*, показывающее филогенетическое положение штамма UR-1 и (Б) конкатенированных последовательностей белков биоминерализации магнетосом (MamABEIHKLMPST). Оба дерева построены с помощью алгоритма maximum-likelihood с применением модели LG+F+I+G4. Маркер, 0.05 замен на аминокислотную позицию.

Было также проведено сравнение филогенетических деревьев, построенных на основе конкатенированных последовательностей белков кластеров *tamAB* и *tamHIE* (Рис. 18). В результате было показано, что оба дерева были, в основном, коллинеарны друг другу, за исключением положения ветвей, которые формировали HCHbin5 и DC0425bin3. Однако, ветвление дерева MamHIE имело низкую поддержку «bootstrap», следовательно, решение

вопроса эволюции разных кластеров у этих двух штаммов требует дальнейших исследований и большего количества геномных последовательностей ‘*Ca. Etaproteobacteria*’. Несмотря на это, на основании сравнения топологии этих двух деревьев можно утверждать, что эволюционная история *tamAB* и *tamHIE* кластеров была, в основном, одинаковой у ‘*Ca. Etaproteobacteria*’

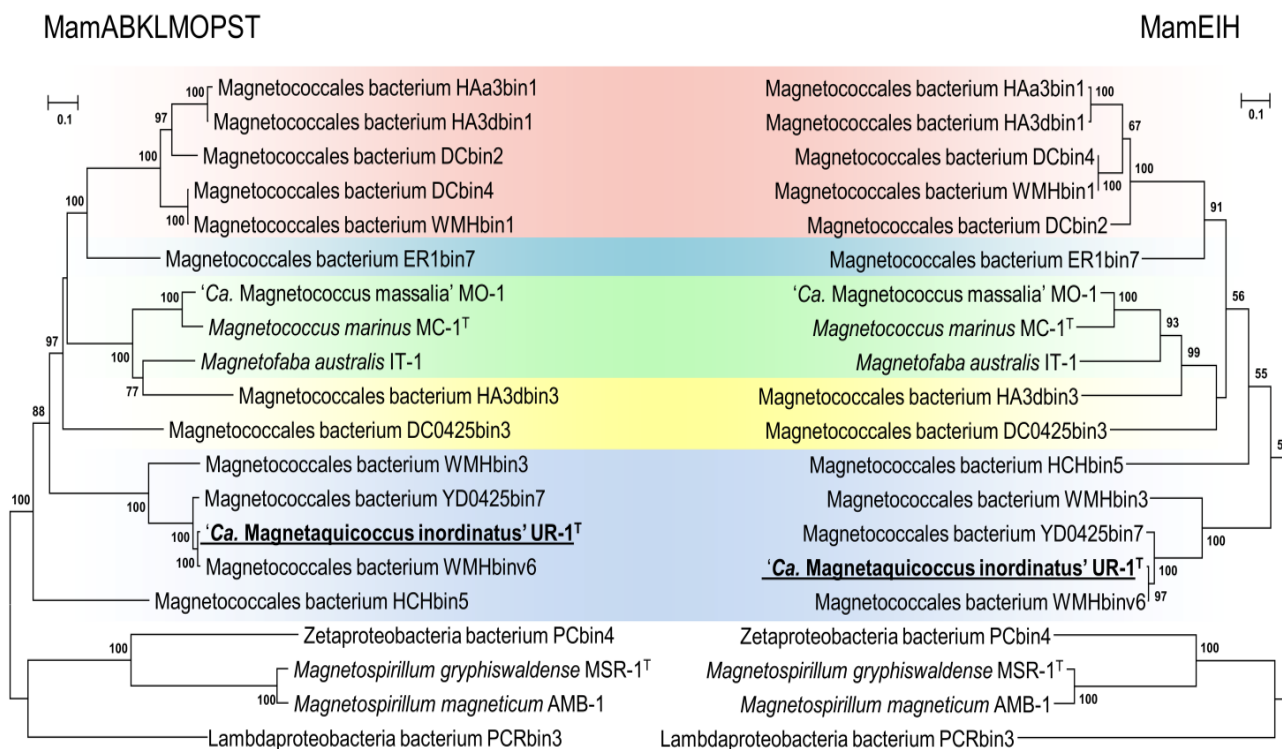


Рисунок 18. Сравнение филогенетических деревьев, построенных на основе конкатенированных магнетосомных белков кластеров MamABKLMOPST (2077 аминокислотных позиций) and MamEIH (885 аминокислотных позиций) Оба дерева построены с помощью алгоритма maximum-likelihood с применением модели LG+F+I+G4. Маркер, 0.1 замен на аминокислотную позицию.

Кроме неколлинеарности деревьев интересным был замечен еще один интересный результат. На филогеномном дереве скорость замен между штаммами UR-1 и WMHbinv6 была намного выше, чем на дереве магнетосомных белков (Рис. 17). Такое различие может указывать на недавний горизонтальный перенос у этих двух штаммов (Koonin, Makarova, Aravind, 2001; Syvanen, 1994). Это предположение было далее исследовано с использованием программы RecentHGT (Li et al., 2018), которая позволяет обнаруживать события горизонтального переноса между близкородственными видами. В качестве контроля была взята последовательность генома штамма

YD0425bin7, который является наиболее близким родственным штаммов к UR-1 и WMHbinv6. С использованием RecentHGT были рассчитаны значения сходства последовательностей всех гомологичных генов между WMHbinv6, YD0425bin7 и UR-1. Анализ полученных данных показал, что все значения между штаммами YD0425bin7 и WMHbinv6, а также штаммами UR-1 и YD0425bin7, соответствуют распределению Вейбулла (Рис. 19Б, В). Таким образом, никаких признаков недавних событий HGT не было обнаружено между этими двумя парами штаммов. Однако в случае UR-1 и WMHbinv6 значения сходства генов связанных с магнетосомами, не соответствовали распределению Вейбулла (Рис. 19А, Таблица 10). Значения сходства обнаруженных генов составляли 95–100% между UR-1 и WMHbinv6, что намного выше, чем сходство генов домашнего хозяйства. Таким образом, полученные результаты показали, что гены МГО у UR-1 и WMHbinv6 подвергались недавнему событию HGT.

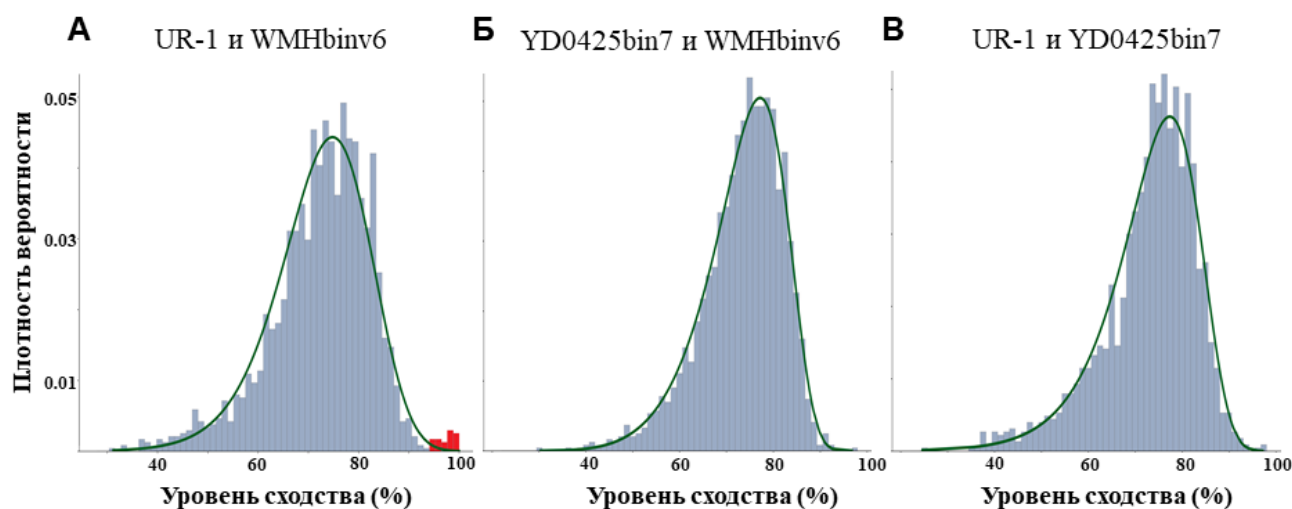


Рисунок 19. Результаты попарного сравнения последовательностей общих генов между А) YD0425bin7 и UR-1. Б) YD0425bin7 и WMHbinv6. В) WMHbinv6 и UR-1. Зеленая линия показывает границы распределения Вейбулла. Распределение уровня сходства последовательностей ортологичных и горизонтально перенесенных генов выделено синим и красным соответственно.

Таблица 10 - Гены, предположительно возникнувшие у UR-1 вследствие горизонтального переноса

Ген	UR-1 против WMHbinv6			UR-1 против YD0425bin7			YD0425bin7 против WMHbinv6		
	UR-1 локус	WMHbinv6 локус	Сходство (%)	UR-1 локус	YD0425bin7 локус	Сходство (%)	YD0425bin7 локус	WMHbinv6 локус	Сходство (%)
ГБ	RS01505	PDZV_v1_10180	100	RS01505	PDZU_v1_400024	63.7	PDZU_v1_400024	PDZV_v1_10180	63.7
<i>cheY</i>	RS01500	PDZV_v1_10179	100	RS01500	PDZU_v1_400025	73.5	PDZU_v1_400025	PDZV_v1_10179	73.5
<i>mamN</i>	RS01570	PDZV_v1_10193	99.2	RS01570	PDZU_v1_400011	79.7	PDZU_v1_400011	PDZV_v1_10193	78.5
<i>mamL</i>	RS01580	PDZV_v1_10195	99	RS01580	PDZU_v1_400009	64.4	PDZU_v1_400009	PDZV_v1_10195	65.3
<i>mamI</i>	RS01605	PDZV_v1_10200	99	RS01605	PDZU_v1_400004	84.6	PDZU_v1_400004	PDZV_v1_10200	85.5
<i>motB</i>	RS01630	PDZV_v1_10205	99	RS01630	-	-	-	PDZV_v1_10205	-
<i>mamA</i>	RS01555	PDZV_v1_10190	98.8	RS01555	-	-	-	PDZV_v1_10190	-
<i>mamD-like</i>	RS01620	PDZV_v1_10203	98.7	RS01620	PDZU_v1_400001	79.8	PDZU_v1_400001	PDZV_v1_10203	80.5
DMT белок	RS01470	PDZV_v1_10174	98.5	RS01470	-	-	-	PDZV_v1_10174	-
анти-сигма-фактор	RS01510	PDZV_v1_10181	98	RS01510	PDZU_v1_400023	74.3	PDZU_v1_400023	PDZV_v1_10181	75.2
<i>mamB</i>	RS01545	PDZV_v1_10188	98	RS01545	PDZU_v1_400016	86.7	PDZU_v1_400016	PDZV_v1_10188	86.2
Гистидин киназа A	RS01475	PDZV_v1_10175	98	RS01475	PDZU_v1_400028	70	PDZU_v1_400028	PDZV_v1_10175	71
<i>mamH</i>	RS01610	PDZV_v1_10201	97.8	RS01610	PDZU_v1_400003	81.4	PDZU_v1_400003	PDZV_v1_10201	82
<i>mamS</i>	RS01540	PDZV_v1_10187	97.3	RS01540	PDZU_v1_400017	74.5	PDZU_v1_400017	PDZV_v1_10187	72.2
ГБ	RS01595	PDZV_v1_10198	96.9	RS01595	PDZU_v1_400006	64.9	PDZU_v1_400006	PDZV_v1_10198	63.9
ГБ	RS01625	PDZV_v1_10204	96.9	RS01625	-	-	-	PDZV_v1_10204	-
<i>mamE</i>	RS01600	PDZV_v1_10199	96	RS01600	PDZU_v1_400005	78	PDZU_v1_400005	PDZV_v1_10199	78
<i>mamM</i>	RS01575	PDZV_v1_10194	95.9	RS01575	PDZU_v1_400010	82.6	PDZU_v1_400010	PDZV_v1_10194	83.4
<i>mamT</i>	RS01535	PDZV_v1_10186	95.4	RS01535	PDZU_v1_400018	83.5	PDZU_v1_400018	PDZV_v1_10186	84.8
<i>mamO</i>	RS01565	PDZV_v1_10192	95.2	RS01565	PDZU_v1_400012	79.8	PDZU_v1_400012	PDZV_v1_10192	80.4
ГБ	RS01635	PDZV_v1_10206	95	RS01635	-	-	-	PDZV_v1_10206	-
ГБ	RS01530	PDZV_v1_10185	94	RS01530	PDZU_v1_400019	77.8	PDZU_v1_400019	PDZV_v1_10185	79
<i>feoA</i>	RS01640	PDZV_v1_10207	93.4	RS01640	-	-	-	PDZV_v1_10207	-

При сравнении структуры МГО кокка UR-1 с таковой у других штаммов было обнаружено, что представители семейства ‘*Ca. Magnetaquicossaceae*’: UR-1, WMHbin6, YD0425bin7, WMHbin3 и HCHbin5, имеют схожий набор генов биоминерализации магнетосом. У всех них присутствует ген *tamN* в *tamAB* кластере, в отличие от других представителей порядка *Magnetococcales*. При поиске ближайших гомологов для MamN, наибольший уровень сходства был с белком, принадлежащим *Magnetovibrio blakemorei* (43.89%) (Таблица A1) (Trubitsyn et al., 2016). Кластер генов *tamCXZ* не был обнаружен в геномах UR-1 и ближайших видов, также как и гены *tamA*-like и *mms6*, присутствующие в геномах *Magnetocossaceae* и других трех семейств. Также их отличием являлось наличие гена, расположенного между *tamK* и *tamE*. Кодированный им белок не имел гомологии ни с одним из белков базы GenBank и, вероятно, является специфичным для представителей семейства ‘*Ca. Magnetaquicossaceae*’. Он был обозначен как *maq1* (специфичный для ‘*Magnetaquicossaceae*’). Другие три гена, кодирующие белки с неизвестной функцией были обнаружены между *tamD*-like и *feoA1* генами. Эти три гена были найдены только у WMHbin6 и WMHbin3. Наиболее близкими к ним были белки, присутствующие у немагнитотактических *Gamma*- и *Deltaproteobacteria*. Организация и расположение этих трех генов было идентичным у UR-1 и WMHbin6; у WMHbin3 этот кластер находился на 9 т.п.о. ниже гена *tamT*, рядом с ними располагались гены *feoAB1*. Еще одно сходство в организации МГО между UR-1 и WMHbin6 наблюдалось для 11 генов, находящихся ниже *tamT*. Восемь и семь из них также были найдены у ближайших к UR-1 кокков YD0425bin7 и WMHbin3 соответственно, они были организованы в том же порядке, что и у UR-1. Белки, кодируемые этими генами, в основном, ассоциированы с хемотаксисом. В то же время у HCHbin5, который входит в один и тот же род с UR-1, наблюдалось отличие в строении МГО. В его *tamAB* кластере присутствовали дополнительные гипотетические белки, наблюдалось заметное различие в строении генов, фланкирующих основной кластер магнетосомных генов, также у него присутствовали *tamXZ* гены, которых нет у

других представителей его семейства. Также у HCHbin5 ген, находящийся между *tamK* и *tamE*, имел низкий уровень сходства (покрытие 5%) с геном *maq1* других ‘*Ca. Magnetaquicossaceae*’.

В заключение вышесказанного, магнитотактические кокки UR-1, WMHbin6, YD0425bin7 и WMHbin3 имели сходный набор и организацию магнетосомных генов. Это может указывать на то, что перечисленные штаммы могут синтезировать магнетосомы с одинаковой организацией. Принимая во внимание значительные отличия HCHbin5, как по идентичности, так и по строению острова, он, возможно, может образовывать магнетосомы с другой организацией.

8.5.2. Анализ метаболизма кокка UR-1.

Сравнение генома UR-1 с геномами других пресноводных близкородственных штаммов позволило определить специфические метаболические особенности, которые подтверждают предлагаемое разделение изученных штаммов на отдельные филогенетические группы.

8.5.2.1. Метаболизм азота.

В геноме UR-1 был обнаружен полный набор генов *nif*, необходимых для фиксации N₂. Анализируемый геном содержал 18 *nif* генов в виде кластера *nifVXNEBQHDKTY* и гена *nifA*, локализованного отдельно, приблизительно в 7 т.п.о. ниже *nifY*. Ген *nifU*, кодирующий белок, который предположительно обладает окислительно-восстановительной функцией для сборки Fe-S кластера в комплексе нитрогеназы, также был обнаружен и расположен в другом хромосомном локусе (Agar et al., 2000). В отличие от MC-1^T и MO-1, геном UR-1 не содержал гена *nifZ*, продукт которого играет вспомогательную, но не существенную роль в созревании Р-кластеров MoFe нитрогеназы (Jimenez-Vicente et al., 2019). Интересно, что этот ген отсутствует в геномах нескольких других некультивируемых пресноводных штаммов: YD0425bin7, WMHbin3, WMHbin1, DC0425bin3, DCbin4 и HA3dbin1, что позволяет предположить, что у них может существовать другой механизм созревания комплекса

нитрогеназы. Однако, нельзя исключить, что этот ген мог отсутствовать из-за неполноты последовательности.

UR-1 потенциально способен к ассимиляции и диссимиляции нитрата. Оперон *nar*, кодирующий периплазматическую нитратредуктазу (Nar) и необходимые для ее формирования гены, содержал 6 генов - *narDAGHBC*. У UR-1 отсутствовал ген негемового железо-серного белка NarF, который является первым геном оперона у большинства денитрифицирующих бактерий, включая MC-1^T и MO-1. В дополнение к *nar*, был обнаружен оперон, кодирующий альфа-, бета- и гамма-цепи мембраносвязанной нитратредуктазы NarGHI. Ген белка, имеющего высокое сходство с TorD-like шаперонами был также обнаружен в геноме UR-1. Кодирующий его ген находился в непосредственной близости от *nar* оперона, что означало, вероятно, функциональность оксидоредуктазного комплекса. Относительно низкое сходство белков Nar у UR-1 с таковыми у других бактерий (например, 26.1% с NarG *E.coli*) не позволяет с уверенностью предсказать тип восстанавливаемого субстрата, так как к семейству оксидоредуктаз, к которому относится Nar, принадлежат и другие анаэробные дыхательные оксидоредуктазы, например диметилсульфоксид-, селенат- и хлоратредуктазы (Leimkühler, Silke; Iobbi-Nivol, 2015). Таким образом, это может быть свидетельством способности UR-1 и родственных ему кокков к использованию альтернативных конечных акцепторов электронов.

Присутствие генов *nirBD* и *nirS* в геноме UR-1 свидетельствует о его способности дальнейшего восстановления нитрита, продуцируемого нитратредуктазами, до аммиака и оксида азота соответственно. В геноме UR-1 обнаружены два гена *nirS*. Рядом с одним из них располагался кластер *nirCFGLHJ*. Поскольку этот кластер генов был расположен в конце контига, невозможно определить точную организацию оперона *nir* в геноме UR-1. Таким образом, UR-1 обладает почти всем набором генов, необходимых для синтеза и функциональной сборки нитритредуктазы NirS, отсутствовал только ген *nirE*. Возможно, *nirE* локализован вне *nir* оперона, и он не был обнаружен из-за

неполноты сборки. Вторым ген *nirS* находился рядом с геном, кодирующим цитохром NirC-like. Возможно, что у UR-1 существует второй набор генов биосинтеза NirS, что также невозможно подтвердить из-за неполноты генома. Избыточность генов *nirS* может указывать на важность нитритного дыхания для UR-1.

У UR-1 отсутствовали гены *norBC*, кодирующие NO-редуктазу, также как и у близкородственных видов WMHbinv6 и HCHbin5 (но не у YD0425bin7, где идентифицирован полный набор генов *nor*). Отсутствие *norBC* может быть следствием неполноты геномов. «Усеченные» версии пути денитрификации широко распространены среди бактерий, однако, отсутствие этой части пути является относительно редким из-за опасности накопления высокотоксичного NO (Lycus et al., 2017). Это подразумевает либо альтернативные стратегии предотвращения накопления NO у этих организмов. Либо, что более вероятно, их зависимость от других бактерий, способных к восстановлению NO. Несмотря на отсутствие стадии восстановления NO, UR-1, по-видимому, способен конвертировать N_2O в N_2 на последней стадии денитрификации благодаря наличию N_2O редуктазы *nosZ* и вспомогательных генов *nos* оперона, *nosZDFYL*.

В отличие от морских кокков MC-1^T, MO-1 и IT-1, в геноме UR-1 был обнаружен набор генов для NADH-зависимых ассимиляционной нитрат и нитрит-редуктаз, что говорит о его потенциальной способности к ассимиляционному восстановлению нитратов. Интересно, что присутствие генов ассимиляции нитратов не является распространенным случаем среди некультивированных пресноводных представителей порядка *Magnetococcales*. Эти гены присутствуют только у UR-1 и его близкородственного вида WMHbinv6.

8.5.2.2. Метаболизм серы.

Гены *susN* и *susD*, кодирующие ключевой фермент ассимиляции сульфата, сульфат-аденилаттрансферазу, а также гены 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат-синтазы не были обнаружены в геномах UR-1 и других

пресноводных представителей порядка *Magnetococcales*. Таким образом, UR-1, возможно, не способен ассимилировать сульфат, что согласуется с отсутствием у него специализированных транспортных систем сульфата, которые обычно встречаются у способных ассимилировать сульфат бактерий (Hryniewicz, Kredich, 1991). Учитывая, что МТБ обитают в микроаэробных зонах придонных осадков, которые обычно богаты восстановленными соединениями серы, ассимиляционное восстановление сульфатов для этих организмов должно быть необязательным.

Результаты анализа предсказали, что восстановленные соединения серы могут играть важную роль в метаболизме штамма UR-1. В отличие от MC-1^T, в геноме которого был обнаружен «усеченный» оперон *soxXYZAB* (Schübbe et al., 2009), только гены *soxYX* были найдены у UR-1 и других пресноводных магнитотактических кокков, за исключением HA3dbin3. Тот факт, что обычно гены *soxXYZAB* существуют как единый оперон и все гены *sox*, за исключением *soxYZ*, отсутствуют во всех анализируемых геномах, наиболее вероятно свидетельствует о том, что у большинства пресноводных ‘*Ca. Etaproteobacteria*’ отсутствует путь SOX, а не указывает на то, что гены *sox* не были охвачены секвенированием. Возникает вопрос, являются ли гены *soxYZ* в этих бактериях нефункциональными остатками полного оперона *sox* или они играют роль в другом процессе. Недавнее исследование Dahl et al. продемонстрировали, что один SoxYZ участвует в окислении сульфита у *Allochromatium vinosum*, тогда как другие белки Sox, по-видимому, не играют никакой роли в этом процессе (Dahl et al., 2013). Возможно, у пресноводных магнитотактических кокков SoxYZ способствует окислению сульфита, который является продуктом действия обратной диссимиляционной сульфитредуктазы (rDsr).

UR-1, а также другие магнитотактические кокки потенциально способны к окислению сульфида с помощью флавоцитохром *c* сульфид дегидрогеназы (FccAB). Другой ген окисления сульфида, кодирующий сульфид:хинон оксидоредуктазу (SQR) отсутствует в геноме UR-1. При окислении сульфида с помощью FccAB обычно формируются серные глобулы, которые, однако, не

были обнаружены на имеющихся микрофотографиях ПЭМ UR-1. Сера из глобул в дальнейшем может быть окислена до сульфита с помощью обратной диссимиляционной сульфитредуктазы DsrAB, которая играет незаменимую роль в окислении серных глобул у *Allochromatium vinosum* (Sander, Dahl, 2008). UR-1 содержит две копии генов *dsrABL* и по одной копии кластеров генов *dsrC* и *dsrFEHJOP*, которые, по-видимому, локализованы в четырех разных хромосомных локусах. Присутствие кластеров *dsrEFH* и *dsrL* указывает окислительный тип пути Dsr у UR-1 и родственных ему бактерий (Ghosh, Dam, 2009). Это утверждение подтвердилось и результатами филогенетического анализа, который показал кластеризацию DsrAB, принадлежащих UR-1, в сероокисляющей группе (Рис. 20). Они образовывали монофилетическую ветвь с известными сероокисляющими видами *Chlorobi* и *Ms. marinus*, что соответствовало предыдущему исследованию (Müller et al., 2015). Вторая копия DsrAB, принадлежащая членам порядка *Magnetococcales*, по всей видимости, также принадлежит к сероокисляющей группе, однако она образовывала отдельную монофилетическую ветвь. Из-за их отдаленного положения и отсутствия культивируемого штамма с известным серным метаболизмом тип второй копии DsrAB у *Magnetococcales* требует дальнейшего подтверждения.

В геноме UR-1 и некоторых других пресноводных магнитотактических штаммов также были найдены гены *hdr-like*, кодирующие гетеросульфидредуктазу. Белок Hdr обычно присутствует у метаногенных архей, где он катализирует восстановление гетеродисульфида, образующегося на последней стадии метаногенеза (Wagner et al., 2017). Организация *hdr-like* генов в геноме UR-1 отличается от таковой у хорошо изученных сероокисляющих бактерий, например *Acidithiobacillus caldus*, *Thioalkalivibrio* spp. или *Nyphomicrobium denitrificans*, у которых была обнаружена одинаковая организация генов *hdr*: *hdrC1B1A-hyp-hdrC2B2* (Koch and Dahl 2018).

У UR-1 были найдены только четыре гена *hdr*: *hdrA1A2CB*. Организация оперона и присутствие субъединицы гидрогеназы в HdrA2 позволяет предположить, что этот оперон наиболее вероятно кодирует белки, функционально сходные с другими Hdr-like белками - комплексом QmoABC сульфатредуцирующих и некоторых сероокисляющих бактерий (Ramos et al., 2012). Также были обнаружены гены, кодирующие АТФ-сульфурилазу (Sat) и АФС-редуктазу (AprAB), которые формировали кластер в геноме UR-1. В отличие от MC-1^T и MO-1, UR-1 и другие близкородственные штаммы, по-видимому, обладают потенциалом дальнейшего преобразования сульфита посредством непрямого АМФ-зависимого окисления через образование АФС. В целом, проведенный анализ показал фундаментальные различия в генетических детерминантах окисления серы у UR-1 и родственных ему пресноводных штаммов (за исключением HA3dbin3) по сравнению с морскими кокками MC-1^T, MO-1 и IT-1. Последние, по-видимому, используют путь DsrAB в сочетании с путем SOX, тогда как пресноводные кокки, возможно, используют путь DsrAB в сочетании с Sat-AprBA-QmoABC для окисления серных соединений.

8.5.2.3. Метаболизм фосфора.

Фосфат (P_i) является важным питательным веществом, который часто лимитирован в естественной среде. В геноме UR-1 и близкородственных штаммов WMHbinv6, YD0425bin7 и HCNbin5 обнаружены множественные (до 5) конститутивные транспортеры Pit, обладающие низким сродством к P_i . Гены этих переносчиков были также обнаружены у WMHbin3 и ER1bin7. Кроме этого, геном UR-1 содержит все необходимые гены (*pstD*, *A*, *B*, *S*), кодирующие Pst систему, обладающую высоким сродством к P_i и индуцируемую при низком содержании фосфора в среде (менее 20мкМ) (Rao, Torriani, 1990). Также UR-1 содержит гены специфического транскрипционного регулятора поглощения фосфора PhoU. Интересно, что наличие нескольких копий этих генных кластеров, по-видимому, является обычным явлением среди пресноводных представителей порядка *Magnetococcales*. В отличие от морских

магнитотактических кокков, в анализируемых пресноводных штаммах не было обнаружено систем поглощения фосфоната.

Накопление полифосфатных гранул (поли-Р) является распространенным явлением среди МТБ, таких как MC-1^T и *Magnetospirillum* spp. Микрофотографии ПЭМ UR-1 также показывают заметные темные включения, напоминающие поли-Р (Рис. 12Д). В геноме UR-1 было найдено два гена *ppk2* (WP_130472334 и WP_130472795). Rao в своих исследованиях показал, что полифосфаткиназа (РРК) является основным ферментом, катализирующим перенос АТФ (РРК1) или ГТФ (РРК2) в активный центр белка, при синтезе цепи поли-Р. Эта реакция обратима, и в случае РРК2 используется для синтеза ГТФ из поли-Р (Rao, Gómez-García, Kornberg, 2009). Функции синтеза и утилизации поли-Р возможно разделены между этими двумя ферментами РРК2 у UR-1. Присутствие генов, кодирующих РРК2, но не РРК1, по-видимому, является неотъемлемой особенностью как морских, так и пресноводных магнитотактических кокков. В отличие от морских магнитотактических кокков, в геноме UR-1 и родственных штаммов WMHbinv6, YD0425bin7 и HCHbin5, не было обнаружено генов, кодирующих экзополифосфатазу (РРХ), катализирующую расщепление поли-Р. Также практически у всех *Magnetococcales* отсутствует гены фермента поли-Р: АМФ фосфотрансферазы (РАР). Таким образом, способность к использованию поли-Р, по-видимому, у пресноводных представителей порядка *Magnetococcales*, ограничена описанной выше функцией синтеза ГТФ с помощью РРК2.

8.5.2.4. Метаболизм углерода.

По результатам проведенного анализа было показано, что у UR-1 и многих других близкородственных штаммов присутствуют гены для ACL II типа. Это указывает на то, что вЦТК является общей чертой этой группы бактерий. Однако в пяти геномах (WMHbin1, DCbin2, DCbin4, HA3dbin1 и HAA3bin1) ни одна из субъединиц ACL не была обнаружена, в то время как другие ключевые белки пути вЦТК присутствовали. Интересно, что эти кокки вместе образовывали отдельное семейство-кандидат, что позволяет

предположить наличие другого механизма фиксации углерода, присущего этой группе.

8.5.2.5. Жгутиковый аппарат и хемотаксис.

Магнитотаксис играет важную роль в адаптации UR-1 и родственных ему штаммов к стратифицированной и постоянно меняющейся среде. При анализе микрофотографий ПЭМ, полученных для UR-1 в настоящем исследовании, не были показаны жгутики с достаточным разрешением. Тем не менее, анализ геномных данных позволяет сделать несколько предположений. У UR-1 гены сборки жгутиков были найдены в виде кластеров, расположенных в нескольких контигах. Кроме того, было найдено 7 генов флагеллина *fliC*, распределенных по геному, что указывает на сложность жгутикового аппарата в этом организме. Найденные кластеры содержали полный набор генов для формирования жгутиков III типа, шаперонов, базального тела, «крюка» и флагеллина, а также белков аппарата мотора жгутиков, включая специфические белки, переключающие направление вращения мотора.

В результате анализа в геноме UR-1 были выявлены 76 генов, кодирующих основные белки хемотаксиса (CheA, CheY, CheW), белки распознавания и трансдукции сигнала (метил-акцепторный белок (MCP); CheD), адаптации (CheR, CheB, CheV) и удаления фосфата с активированной формы CheY (фосфатазы CheC, CheX) (Szurmant, Ordal, 2004). В геноме UR-1 были обнаружены 30 генов метил-акцепторных белков MCP, что сравнимо с MC-1^T, имеющим 32 MCP (Schübbe et al., 2009). В целом избыточность генов хемотаксиса указывает на потенциальную сложность хемотактического поведения в UR-1 и его важность для адаптации организма в окружающей среде.

Поскольку МТВ населяют микроаэробные зоны донных осадков, они мало подвержены воздействию активных форм кислорода (АФК) по сравнению с аэробными бактериями. В соответствии с этим они характеризуются относительно небольшим числом генов, участвующих в защите от кислородного стресса. В отличие от всех проанализированных штаммов (за

исключением IT-1), UR-1 и близкородственный ему штамм WMHbinv6 имеют как супероксиддисмутазу, так и каталазу I, в дополнение к цитохром с пероксидазам (два гена в UR-1, один в WMHbinv6), тиолпероксидазе и алкилпероксидазе. Это может указывать на более высокую устойчивость к окислительному стрессу у этих видов по сравнению с другими *Magnetococcales*. Проведенный анализ показал, что в геномах YD0425bin7 и HCHbin5, содержится меньше генов для защиты от АФК. В геномах ER1bin7, HA3dbin1 и HAa3bin1 найдено меньшее количество генов защиты от окислительного стресса. Это говорит о том, что эти виды могут быть более избирательными к уровню кислорода в их среде обитания. Предполагаемая схема метаболических процессов у UR-1 приведена на рисунке 21.

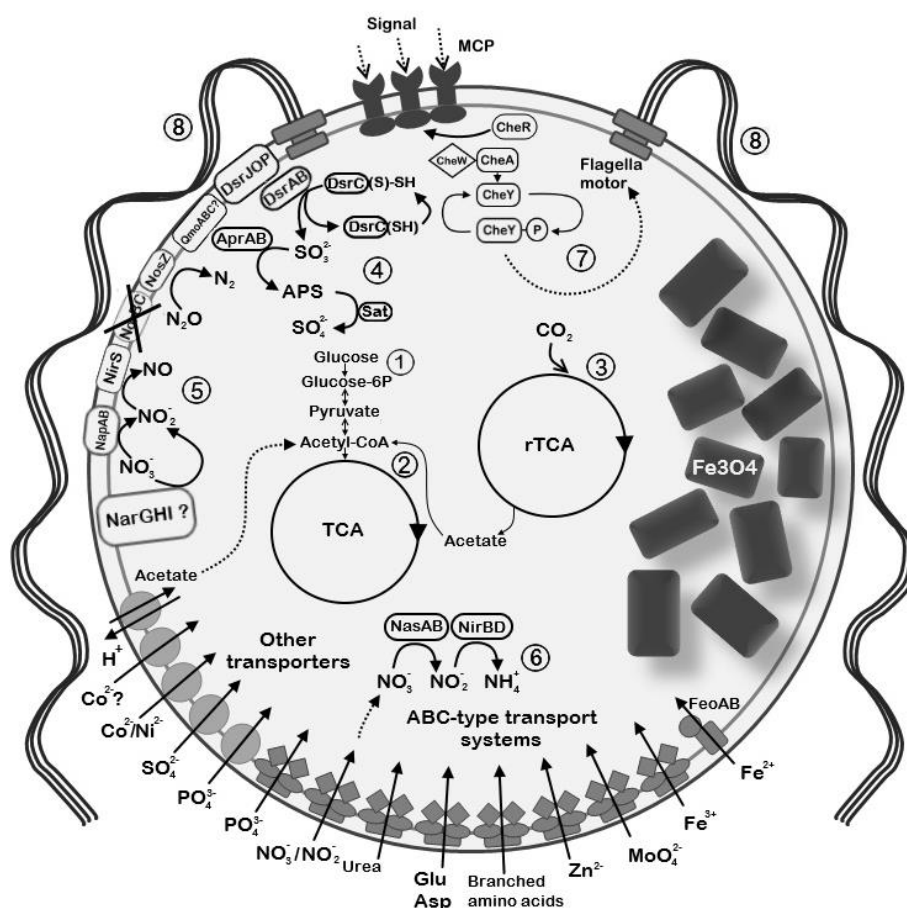


Рисунок 21. Предполагаемая общая схема метаболизма штамма UR-1. (1) Гликолиз и глюконеогенез; (2) ЦТК; (3) фиксация CO_2 с помощью рЦТК; (4) окисление сульфида с помощью пути Dsr. Окисление сульфита до сульфата с помощью AprAB и Sat; (5) Восстановление нитрата через NarAB и NarGHI. Восстановление нитрита с помощью NirS. Отсутствие NorBC. Восстановление N_2O до N_2 с помощью NosZ. (6) Ассимиляция нитрата и восстановление нитритов действием NasA и NirBD. (7) комплекс белков хемотаксиса MCP и Che. (8) Возможное строение жгутиков.

8.6. Характеристика новых предложенных таксонов-кандидатов.

***Candidatus* Magnetaquicoccaceae**

Magnetaquicoccaceae (Mag.net.a.qui.coc.ca.ce'ae. N.L. masc. n. Magnetaquicoccus a *Candidatus* общее имя; -aceae окончание для названия семейства; N.L. fem. pl. n. Magnetaquicoccaceae семейство (*Candidatus* Magnetaquicoccus)

Семейство 'Ca. Magnetaquicoccaceae' характеризуется потенциалом к хемолитоавтотрофному росту с окислением восстановленных серных соединений с помощью Dsr и ассимиляцией углерода с помощью pЦТК (АТФ:цитрат лиаза II). Способность к фиксации атмосферного азота не является общим для представителей семейства: характерно только для UR-1, YD0425bin7 и WMHbin3. Гены для ферментов диссимиляционного восстановления нитратов / нитритов / и оксидов азота присутствуют, но не для всего пути в зависимости от вида. Потенциальная способность к ассимиляции нитрата посредством NasA характерно только для UR-1 и WMHbinv6.

***Candidatus* Magnetaquicoccus**

Magnetaquicoccus (Mag.net.a.qui.coc'cus. Gr. n. *magnes*, -etos магнит; N.L. pref. *magneto* относящийся к магниту; L. fem. n. *aqua* вода; N.L. masc. n. *coccus* (from Gr. masc. n. *kokkos*), кокк; N.L. masc. n. *Magnetaquicoccus*, магнитный кокк из пресной воды)

***Candidatus* Magnetaquicoccus inordinatus**

Magnetaquicoccus inordinatus (in.or.di.na'tus. N.L. masc. adj. *inordinatus* неорганизованный).

Клетки представляют собой одиночные подвижные кокки. Синтезируют неорганизованные в цепочки удлиненные магнетосомы, расположенные в виде кластера у одного края клетки. Магнетосомы состоят из магнетита, средний размер магнетосом 77.4 х 46.4 нм. Обладает потенциалом к хемолитоавтотрофному росту на восстановленных серных соединениях. Потенциально обладает высокой толерантностью к кислороду.

ГЛАВА 9. РАЗНООБРАЗИЕ МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ ОЗЕРА БЕЛОЕ БОРДУКОВСКОЕ.

9.1. Разработка специфичной праймерной системы для идентификации МТБ.

Анализ консервативных областей специфичных для МТБ 9 генов оперона *tamAB* (*tamA*, *tamB*, *tamM*, *tamQ*, *tamO*, *tamI*, *tamP*, *tamK*, *tamE*) позволил отобрать наиболее подходящий для конструирования универсальной для всех МТБ праймерной системы. Из исследуемых генов только ген *tamK* имел наиболее подходящие параметры (размер и уровень сходства между разными таксонами). В результате анализа его консервативных областей было подобрано несколько вариантов праймерных систем, наилучший результат из которых показала работа двух пар праймеров при применении двухстадийной ПЦР. При тестировании разработанной праймерной системы на чистых культурах магнитотактических спирилл был получен продукт нужной длины в 450 п.о. (Рис. 22). В то время как при тестировании на немагнитотактических *Ms. aberrantis* и *E. coli* продукт не образовывался.

При тестировании праймерной системы на образце UR-1, содержащем только представителей порядка *Magnetococcales*, также был детектирован продукт длиной 450 п.о. Секвенирование полученных ПЦР-продуктов показало, что произошла амплификация нужного фрагмента гена *tamK*. При тестировании праймерной системы на ДНК, выделенной из полного микробного сообщества, был также детектирован продукт нужной длины. Таким образом, разработанная праймерная система применима для анализа разнообразия МТБ.

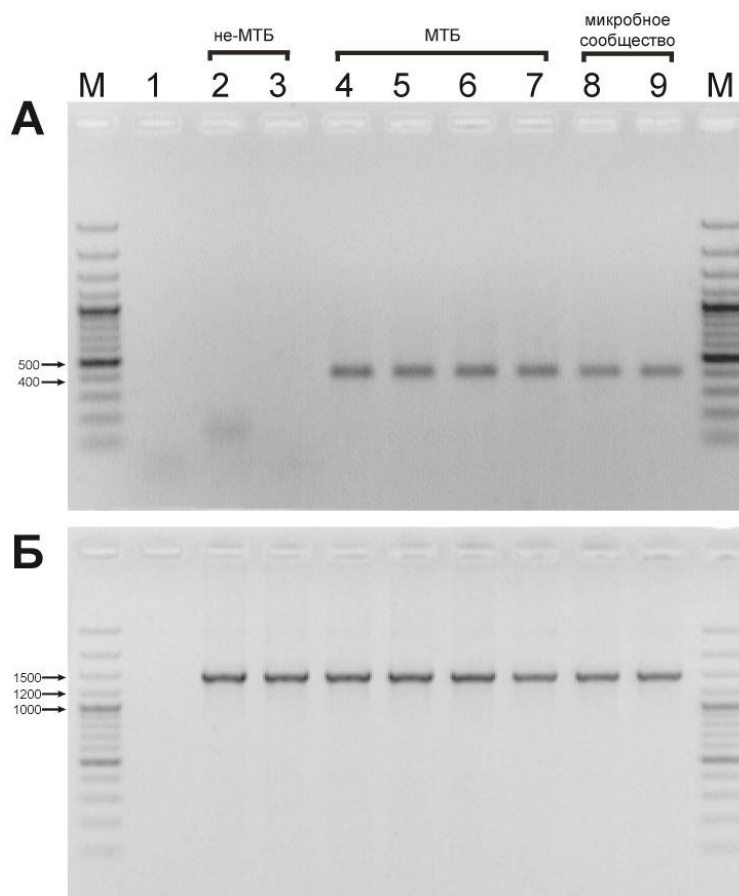


Рисунок 22. Проверка работы праймерной системы на ген *tamK*.. **А)** Ампликоны, полученные в результате двухстадийной ПЦР маркерного гена *tamK*. **Б)** Ампликоны 16S рРНК, используемые в качестве контроля матрицы ДНК. Линия 1 – контроль без ДНК; Линия 2 – *E. coli* DH10B; Линия 3 – *Ms. aberrans* SpK; Линия 4 – *Ms. moscoviense* BB-1; Линия 5 – *Ms. kuznetsovii* LBB-42^T; Линия 6 – *Ms. caucaseum* SO-1^T; Линия 7 – *Magnetococcales bacterium* UR-1; Линия 8 – ДНК полного сообщества р. Москвы; Линия 9 – ДНК сообщества содового озера Киран; Линия М – Маркер молекулярной массы GeneRuler 100bp Plus.

9.2. Характеристика озера Белое Бордуковское и результаты магнитной сепарации клеток МТБ из микрокосма.

Озеро Белое Бордуковское является глубоким озером (до 21 м) и имеет округлую береговую линию. Как предполагается, оно имеет ледниковое происхождение. Вода в озере прозрачная (до 8 м), имеет светло-коричневый цвет. Окраска происходит из-за стока болотных вод в озеро. Во время отбора проб рН воды был 6.3, минерализация – 1%. Для сепарации клеток МТБ из микрокосма применяли метод МТВ-CoSe. Численность МТБ составила $1.12 \pm 0.06 \times 10^6$ в 20 мл отобранного образца. Среди МТБ преобладали вибрионы, также были обнаружены овоидные клетки, которые составляли до 30% от

общей численности бактерий. Кроме того, были обнаружены не отвечающие на магнит клетки, которые присутствовали в небольшом количестве (<1%).

9.3. Анализ филогенетического разнообразия МТБ.

9.3.1. Филогенетический анализ, проведенный на основе последовательностей белка MamK.

Библиотека клонов фрагментов гена *tamK* сообщества МТБ из озера Белое Бордуковское состояла из 346 последовательностей после удаления химер и некачественных чтений. На основе последовательностей белка MamK был проведен филогенетический анализ, в результате которого было выявлено 6 ОТЕ (Таблица 11; Рис. 23А).

Таблица 11. Распределение числа клонов в ОТЕ (последовательности MamK) и ближайшие представители МТБ

Название ОТЕ	Кол-во клонов	Таксономия	Ближайший представитель по последовательности MamK	Уровень сходства, %
MamK_LBB_01	301	<i>Nitrospirae</i>	' <i>Ca. Magnetobacterium bavaricum</i> ' TM-1	61.8
MamK_LBB_02	13	<i>Nitrospirae</i>	' <i>Ca. Magnetominusculus xianensis</i> ' HCH-1	85.4
MamK_LBB_03	25	<i>Nitrospirae</i>	<i>Nitrospirae bacterium</i> MYbin3	87.5
MamK_LBB_04	3	<i>Deltaproteobacteria</i>	MAG_21602_syn32*	97.0
MamK_LBB_05	1	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacterium</i> WMHbin7	100.0
			Fos002	100.0
MamK_LBB_06	3	' <i>Ca. Etaproteobacteria</i> '	HA3dbin1	98.4

* был реконструирован в настоящем исследовании из метабенома 3300021602 (база данных IMG)

MamK_LBB_01, MamK_LBB_02 и MamK_LBB_03 являлись наиболее представленными ОТЕ. На филогенетическом дереве последовательностей эти ОТЕ формировали отдельную ветвь вместе с последовательностями MamK известных представителей филума *Nitrospirae*. ОТЕ MamK_LBB_01 являлась доминирующей (87% клонотеки) и на филогенетическом дереве формировала отдельную ветвь. ОТЕ MamK_LBB_05 и MamK_LBB_06 минорные группы и кластеризовались с MamK, принадлежащими МТБ порядков *Magnetococcales* и *Rhodospirillales*.

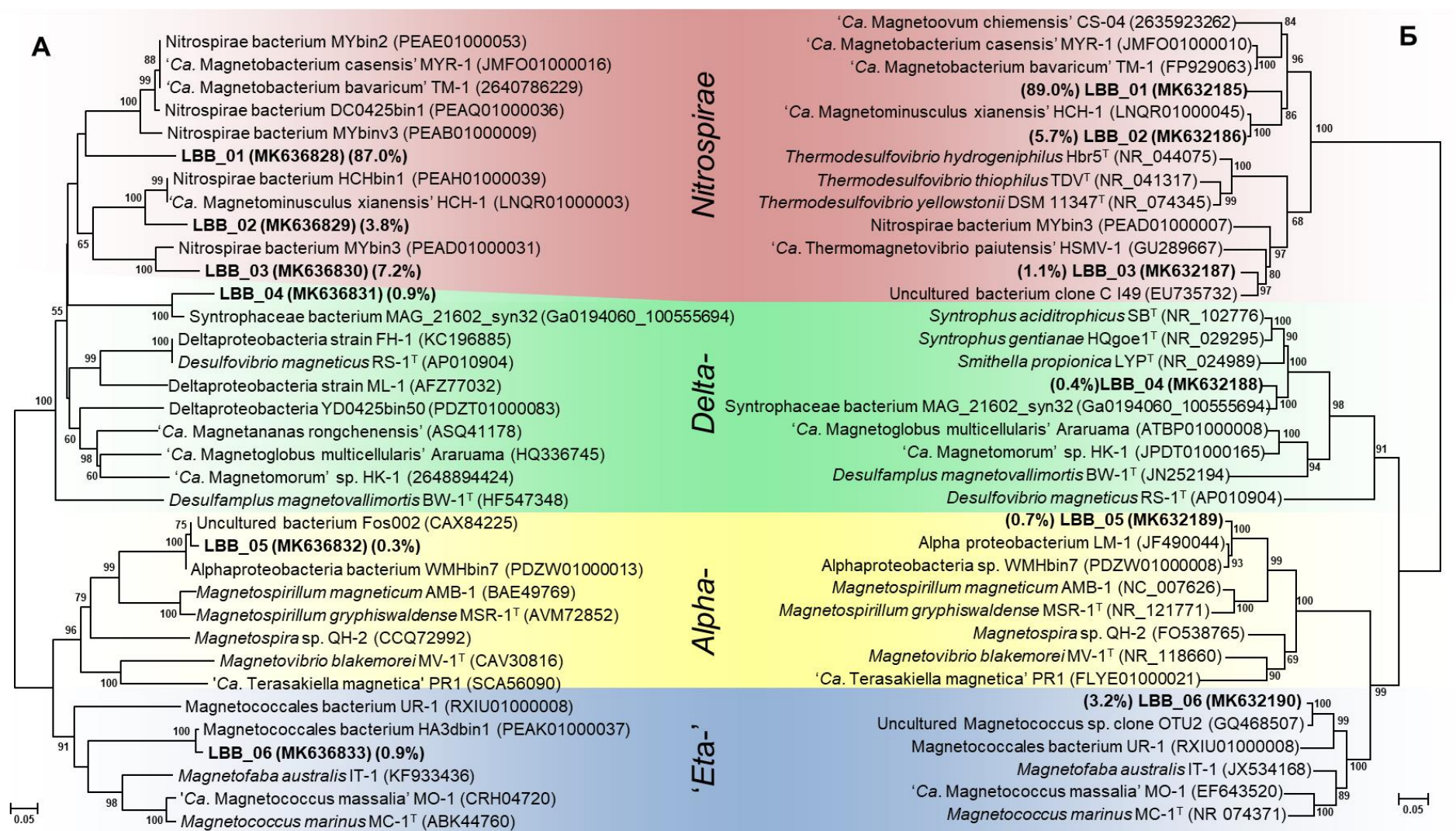


Рисунок 23. Дендрограммы основанные на последовательностях А) белка MamK, Б) 16S рРНК) клональных библиотек МТБ из оз. Белое Бордуковское. Алгоритм maximum-likelihood, эволюционная модель GTR+F+I+G4. Шкала, 0.05 замен на аминокислотную позицию и 0.05 замен на нуклеотидную позицию.

Одним из интересных результатов было наличие ОТЕ MamK_LBB_04, которая не имела близких MamK, принадлежащих ранее описанным магнитотактическим бактериям. Уровень сходства с MamK ближайшего микроорганизма *Nitrospirae bacterium MYbin3* составлял 69.2% при покрытии в 45%. Из-за отсутствия ближайших референсных последовательностей, было затруднительно определить к какому таксону относилась полученная ОТЕ. Таким образом, установление филогенетической принадлежности ОТЕ MamK_LBB_04 требовало более тщательного анализа. В результате поиска ближайших гомологов для MamK_LBB_04, в базе геномов IMG был найден белок с высоким уровнем сходства (97%). Этот MamK был обнаружен в метагеноме 3300021602, который был получен Neufeld et al. из бореального озера в Онтарио (IISD Experimental Lakes Area). В результате биннинга метагенома был получен бин MAG_21602_syn32, содержащий целевую последовательность *tamK*. Кроме *tamK* были также найдены другие магнетосомные гены (*tamI*, *tamE*, *tamQ-1*, and *man2*). Кроме них в контиге рядом с *tamK* был обнаружен ген *man2*. На филогенетическом дереве ОТЕ MamK_LBB_04 вместе MamK, обнаруженным в геноме MAG_21602_syn32, формировали отдельную ветвь между *Nitrospirae* и *Deltaproteobacteria*. Анализ таксономической принадлежности бина показал его принадлежность порядку *Syntrophobacteriales*. Таким образом, ОТЕ MamK_LBB_04 может быть ассоциирована с порядком *Syntrophobacteriales*. Также в геноме MAG_21602_syn32 была идентифицирована последовательность гена 16S рРНК (№ Ga0194060_100555694).

9.3.2. Филогенетический анализ, проведенный на основе последовательностей гена 16S рРНК.

Была получена библиотека генов 16S рРНК, которая состояла из 282 последовательностей. Полученные последовательности были сгруппированы в 6 ОТЕ (Таблица 12). На их основе было построено филогенетическое дерево (Рис. 23Б).

Таблица 12. Распределение числа клонов в ОТЕ (последовательности гена 16S рРНК) и ближайшие представители МТБ

Название ОТЕ	Кол-во клонов	Таксономия	Ближайший ген 16S рРНК в GenBank	Сходство, %
16S_LBB_01	251	<i>Nitrospirae</i>	' <i>Ca. Magnetobacterium bavaricum</i> ' TM-1	92.2
			' <i>Ca. Magnetominusculus xianensis</i> ' HCH-1	89.9
			' <i>Ca. Magnetoovum mohavensis</i> '	89.0
16S_LBB_02	16	<i>Nitrospirae</i>	' <i>Ca. Magnetominusculus xianensis</i> ' HCH-1	99.2
16S_LBB_03	3	<i>Nitrospirae</i>	<i>Nitrospirae</i> bacterium MYbin3	92.8
16S_LBB_04	1	<i>Deltaproteobacteria</i>	MAG_21602_syn32*	96.8
16S_LBB_05	2	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacterium</i> LM-1	98.5
			<i>Alphaproteobacterium</i> WMHbin7	98.3
16S_LBB_06	9	' <i>Ca. Etaproteobacteria</i> '	<i>Magnetococcus</i> sp. clone OTU2	98.9

*был реконструирован в настоящем исследовании из метагенома 3300021602 (база данных IMG)

Более 95% от клональной библиотеки последовательностей генов 16S рРНК (ОТЕ 16S_LBB_01 – ОТЕ 16S_LBB_03) кластеризовались с представителями филума *Nitrospirae*. Доминирующая ОТЕ 16S_LBB_01 формировала отдельную ветвь внутри семейства '*Ca. Magnetobacteraceae*'. ОТЕ 16S_LBB_06 и MamK_LBB_05 формировали ветви с представителями классов *Magnetococcales* и *Rhodospirillales*, соответственно, и вместе представляли 3.9% от клональной библиотеки.

На филогенетическом дереве последовательность ОТЕ 16S_LBB_04 формировала отдельную ветвь вместе с представителями семейства *Syntrophaceae*. Последовательность 16S рРНК, полученная из бина MAG_21602_syn32 также входила в этот кластер и имела уровень сходства 96.8% с ОТЕ 16S_LBB_04. Уровень сходства с ближайшими валидно описанными штаммами *Syntrophus aciditrophicus* и *Smitella propionica* составил 93.5% и 91.2% соответственно, что говорит о возможной принадлежности полученной нами ОТЕ 16S_LBB_04 к новому роду внутри семейства *Syntrophaceae*.

Топология полученных деревьев, в основном, была конгруэнтной, также на обоих деревьях присутствовали ОТЕ, принадлежащие схожим таксономическим группам (Рис. 23). Таким образом, для всех ОТЕ, выявленных на дереве MamK была определена соответствующая ОТЕ на дереве 16S рРНК. Возможно, что эти последовательности генов *tamK* и 16S рРНК принадлежат одному организму, однако это требует дальнейших исследований.

Последовательности MamK и 16S рРНК были депонированы в GenBank под номерами MK636828-33 и MK63285-90, соответственно.

9.4. Идентификация морфологии представителей новых групп МТБ.

Чтобы соотнести филогенетические данные с морфотипом бактерии, был применен метод FISH-ПЭМ (Рис. 24).

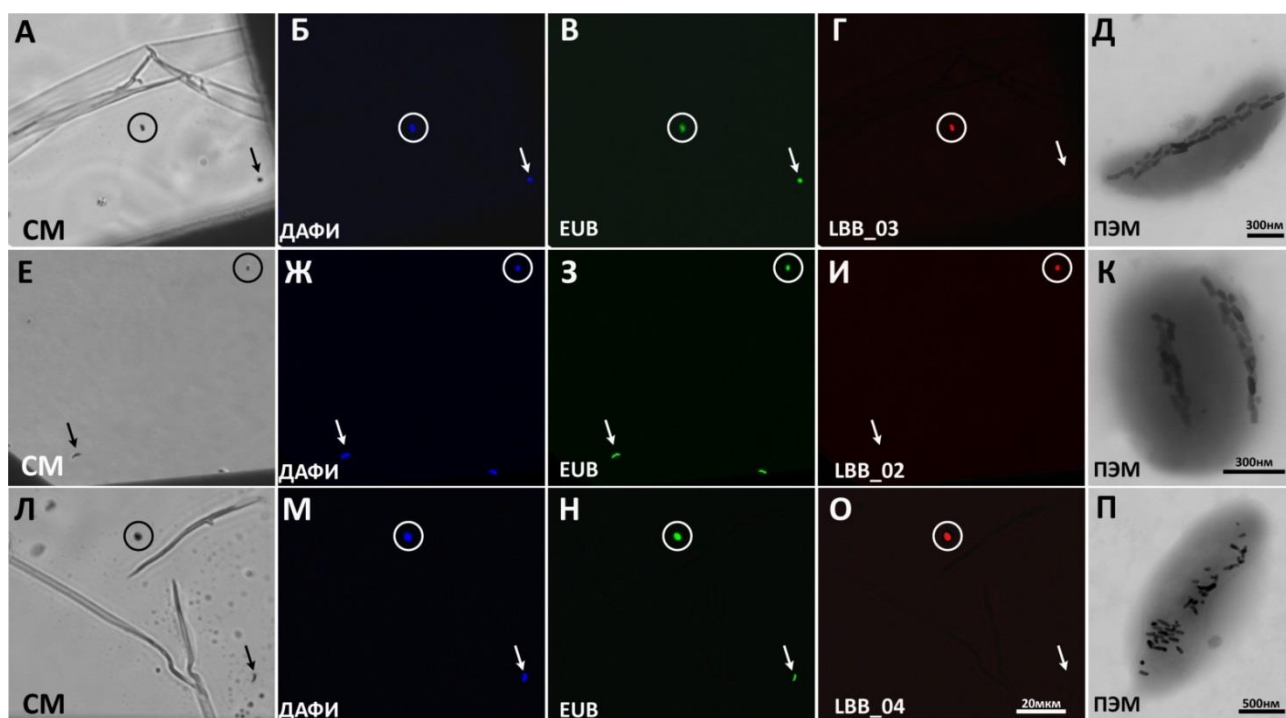


Рисунок 24. Результаты FISH-ПЭМ МТБ озера Белое Бордуковское. Кружками выделена клетка, гибризованная со специфичным зондом. Стрелки указывают на клетку, которая не гибридуется со специфичным зондом. А, Е и Л) Фазово-контрастное изображение. Б, Ж и М) Окрашивание ДАФИ. Бактерии, присутствующие в той же самой области, что и на А, Е и Л, соответственно. В, З и Н) Гибризация бактериальных клеток с зондом EUV. Г, И и О) Гибризация со специфичными зондами. Д, К и П) ПЭМ изображения гибризованных клеток, изображенных на Г, И и О соответственно.

В результате, зонд LBB_03 был соотнесен с вибриоидной клеткой, формирующей одну цепь анизотропных магнетосом (Рис. 24А-24Д). Зонд LBB_02 гибридизовался с небольшой клеткой овоидной формы, формирующей две цепочки магнетосом с анизотропными кристаллами (Рис. 24Е-24К). Форма клеток и организация магнетосом у бактерий ОТЕ 16S_LBB_02 были схожи с таковыми у *Nitrospirae* МТВ МУЗ-11А. Флуоресцентным зондом на ОТЕ 16S_LBB_04 была идентифицирована МТВ в форме палочки с дезорганизованными магнетосомами, расположенными близко к центру тела бактериальной клетки (Рис. 24Л-24П).

Для ОТЕ 16S_LBB_06 и 16S_LBB_05 FISH-ПЭМ не был проведен. Но, при анализе полученных нами ПЭМ изображений была обнаружена фотография кокковидной клетки с единственной цепочкой удлиненных магнетосом (Рис. 25А). ПЭМ изображение спирали с цепочкой кубооктаэдрических магнетосом было также обнаружено (Рис. 25Б).

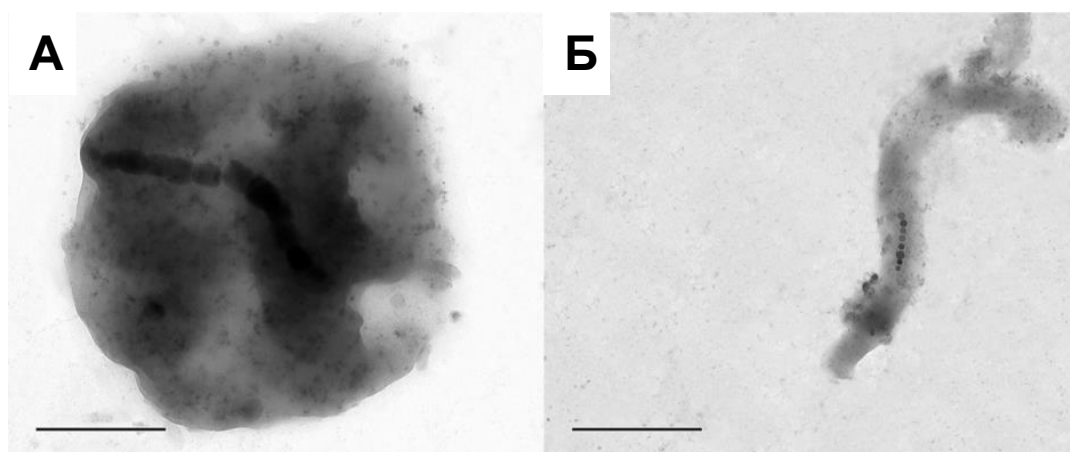


Рисунок 25. Микрофотографии клеток МТВ, полученные с помощью ПЭМ. А) Кокк, Б) Спирилла. Размерная линейка – 0.5 мкм.

9.5. Описание доминирующей ОТЕ LBB_01 в качестве нового вида-кандидата '*Ca. Magnetomonas plexicatena*'.

9.5.1 Морфология бактерии LBB_01.

Специфичный на доминирующую ОТЕ 16S_LBB_01 зонд LBB_01 гибридизовался только с вибриоидными бактериями, как показано на рисунках

26А-26Г. Изображения ПЭМ той же области, где был детектирован сигнал, показали, что эта группа МТБ формировала двойную цепочку магнетосом, которая расположена вдоль длинной оси тела клетки (Рис. 26Г, Д). Наблюдаемые магнетосомы были анизотропными (Рис. 26Е) и имели [111] ось удлинения. Кроме того, изображение быстрого преобразования Фурье (БПФ) кристаллической структуры магнетосом соответствовала магнетиту (Рис. 26Ж).

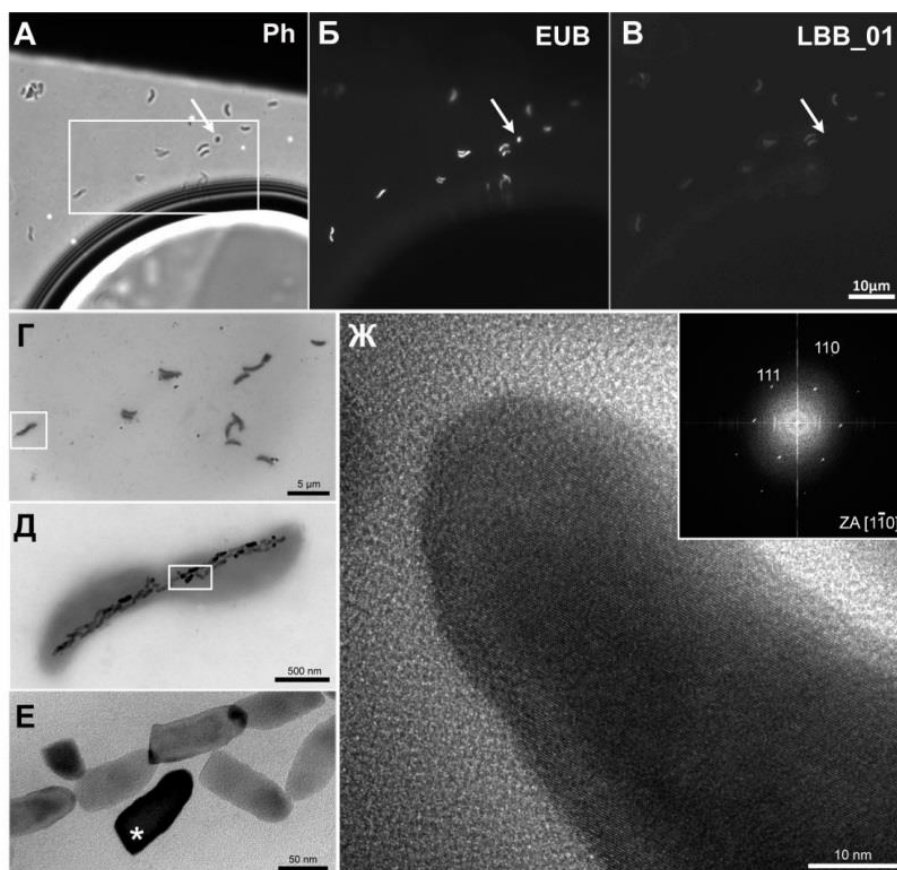


Рисунок 26. Результаты FISH-ПЭМ доминирующей группы МТБ LBB_01 и ПЭМ ВР магнетосом этого микроорганизма. А) фазово-контрастное изображение образца. Б) Гибридизация с зондом EUB. В) Гибридизация со специфичным зондом для LBB_01. Стрелка указывает на небольшой кокк, присутствующий в образце, который не был гибридизован с зондом. Г) ПЭМ изображение региона, помеченного белым прямоугольником на рисунке А. Д) Увеличение площади, выделенной на рисунке Г, показана цепь анизотропных магнетосом, организованных вдоль длинной оси клетки. Е) Увеличение области внутри квадрата на рисунке Д. Магнетосомы этой клетки имели неровные края и форму пули. Ж) ПЭМ ВР магнетосомы, отмеченной звездочкой на рисунке Е. БПФ кристаллической структуры магнетосомы показывает, что магнетосомы состоят из магнетита, и имеют ось удлинения [111].

Дальнейший анализ клеток, идентифицированных с помощью зонда LBB_01, показал, что клетки имели длину 2.0 ± 0.4 мкм и ширину 0.5 ± 0.1 мкм

($n = 32$). Каждая клетка содержала 33 ± 9 анизотропных магнетитовых магнетосом ($n = 32$), организованных, как описано выше (Рис. 26Д). Кончики магнетосом не всегда были ориентированы в одну сторону и иногда были противоположны друг другу (Рис. 26Е), как уже было показано для других МТБ формирующих анизотропные кристаллы (Leão et al., 2017). Незрелые кристаллы были обнаружены в разных частях цепочек. Детальный анализ размеров магнетосом показал, что они имеют среднюю длину и ширину 108 ± 21.1 нм и 45 ± 8.1 нм соответственно. Средний коэффициент формы (ширина/длина) был равен 0.45 ($n = 1061$; Рис. 27).

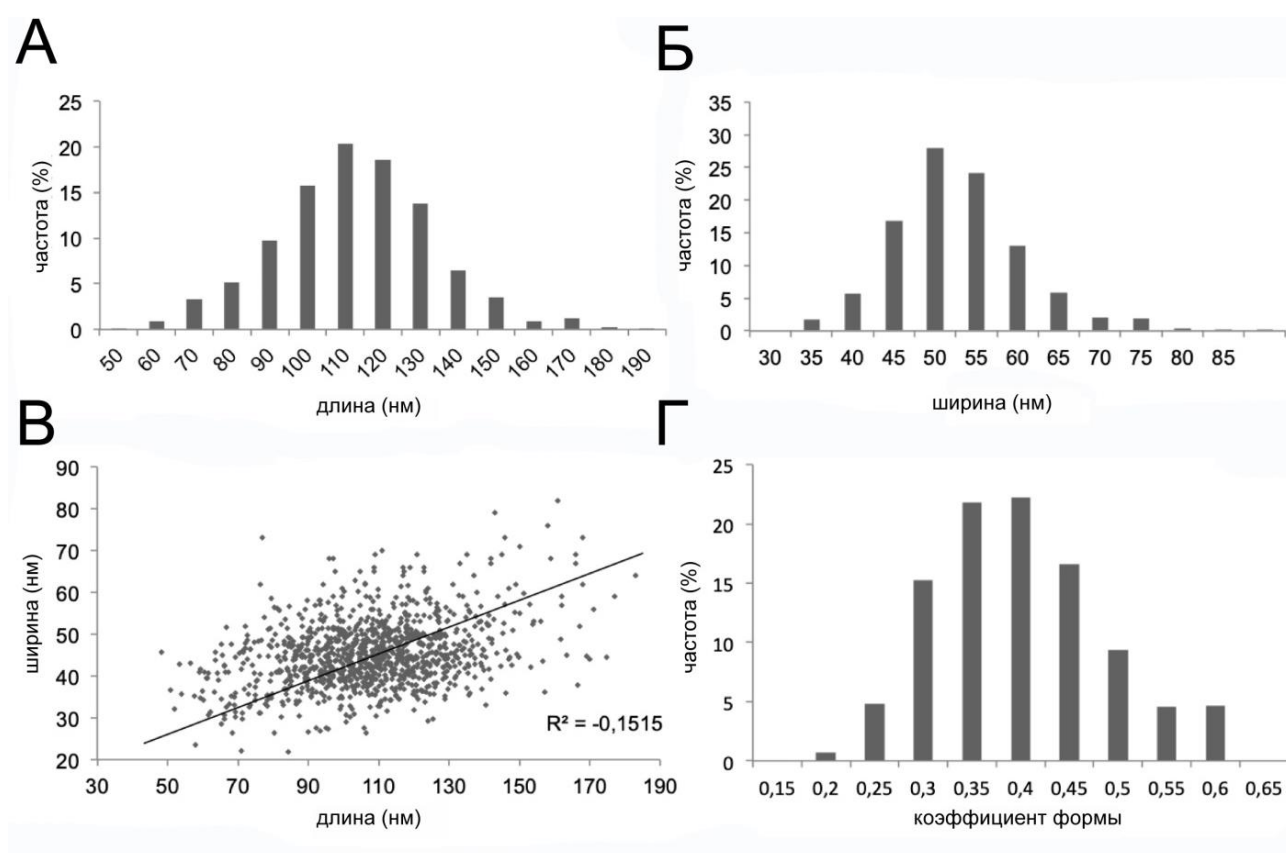


Рисунок 27. Размеры кристаллов магнетосом штамма LBB_01. А) Распределение длины; Б) Распределение ширины; В) Длина относительно ширины (соотношение сторон) (линия тренда $R^2 = -0,1515$); Д) Распределение коэффициента формы.

9.5.2. Секвенирование и анализ генома бактерии LBB_01.

Был секвенирован метагеном сепарированных клеток МТБ, в результате биннинга которого был реконструирован геном доминирующей группы

LBB_01. Он состоял из 1154 контигов размером 2.3 млн. п.о. Полнота сборки генома составляла 65.15%, контаминация - 1.87%. G+C состав составлял 42.1%. Последовательность была депонирована в GenBank под номером SNNQ000000000.

С целью определить филогенетическое положение полученного генома было построено филогеномное дерево (Рис. 28). '*Ca. Magnetobacterium bavaricum*' TM-1 and '*Ca. Magnetoovum chiemensis*' CS-04 не были взяты в анализ из-за высоких значений контаминации геномов (34% и 17% соответственно).

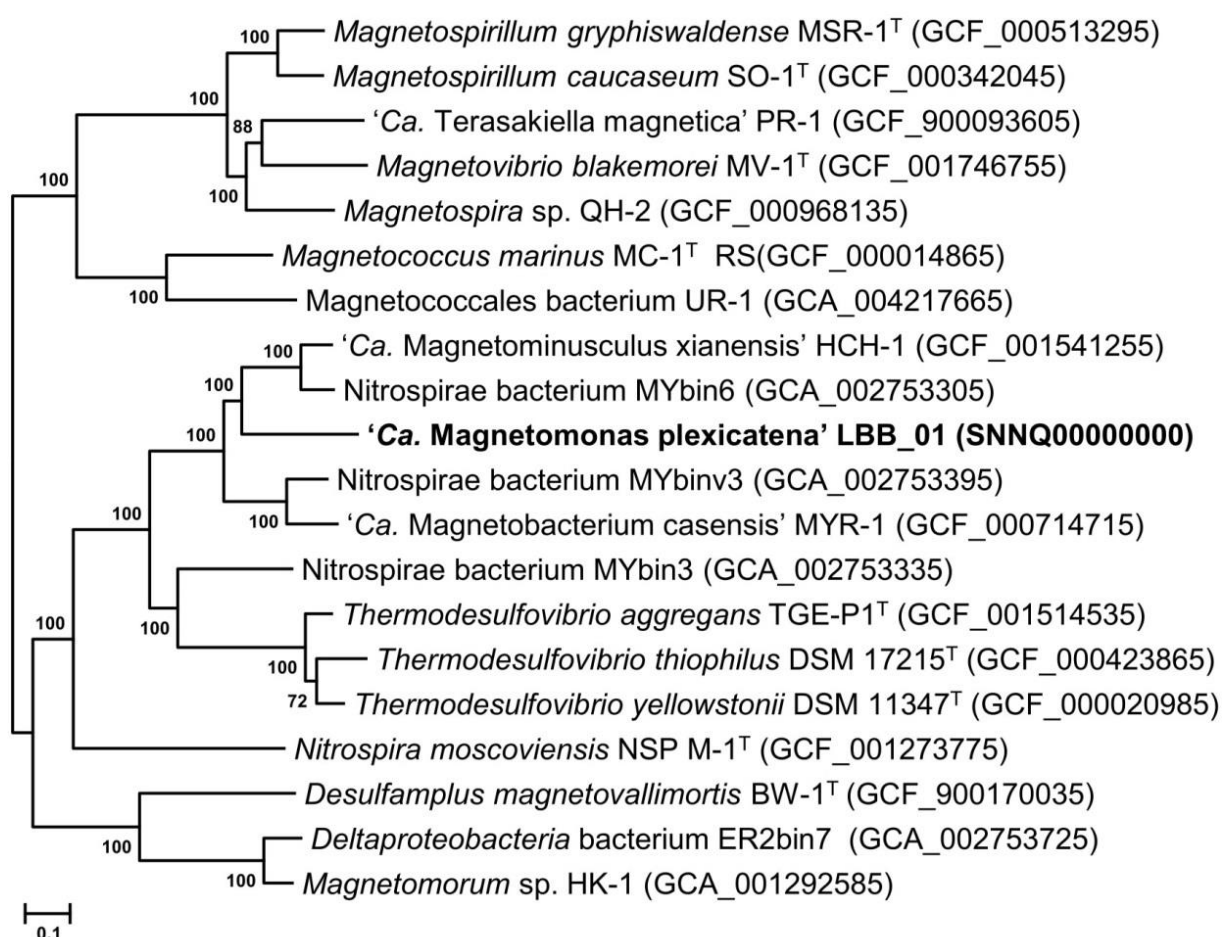


Рисунок 28. Филогенетическое дерево, построенное на основе конкатенированных аминокислотных последовательностей коровых белков (34747 аминокислотных оснований). Алгоритм maximum-likelihood, эволюционная модель LG+F+I+G4. Шкала, 0.1 замена на аминокислотную позицию.

В результате, исследуемый геном LBB_01 и геномы представителей рода *Thermodesulfovibrio* образовывали отдельную ветвь от культивируемого штамма *Nitrospira moscoviensis* NSP M-1^T. Внутри этой ветви геном LBB_01, вместе с другими МТБ, кластеризовался отдельно от рода *Thermodesulfovibrio*. Также как и на дереве, построенном на основании последовательности гена 16S рРНК, LBB_01 формировал отдельную от ‘*Ca. Magnetobacterium*’ и ‘*Ca. Magnetominusculus*’ ветвь.

Порядок ветвления филогеномного дерева и различие в 15% по последовательности гена 16S рРНК с ближайшим культивируемым видом *Thermodesulfovibrio hydrogeniphilus* позволяет отнести штамм LBB_01 к отдельному семейству. Различие в 8% с бактериями кандидатного рода ‘*Ca. Magnetobacterium*’ позволяет отнести штамм к новому роду- и виду-кандидату внутри семейства-кандидата ‘*Ca. Magnetobacteriaceae*’. К семейству ‘*Ca. Magnetobacteriaceae*’ на данный момент относится несколько родов-кандидатов, к которым принадлежат только МТБ: ‘*Ca. Magnetobacterium*’, ‘*Ca. Magnetoovum*’ и ‘*Ca. Magnetominusculus*’. Представители этих родов отличаются между собой по морфологии: представители рода ‘*Ca. Magnetobacterium*’ ‘*Ca. Mb. bavaricum*’, ‘*Ca. Mb. casensis*’ и бактерия озера Миюн ‘*Ca. Magnetobacterium bavaricum*’-like имеют форму палочек и синтезируют множество цепочек пулевидных магнетосом (Lin et al., 2011). Представители рода ‘*Ca. Magnetoovum*’ ‘*Ca. Mo. chiemensis*’ CS-04 (Li et al., 2015) и ‘*Ca. Mo. Mohavensis*’ LO-1 представляют собой крупные овоиды и синтезируют 100-200 магнетосом на клетку (Lefèvre et al., 2011c). Для бактерии рода ‘*Ca. Magnetominusculus*’ ‘*Ca. Mm. xianensis*’ HCH-1 ранее не была показана морфология (Lin et al., 2017). Однако ранее было показано, что HCH-1 имел уровень сходства 100% с *Nitrospirae* МТБ MY3-11A, которая является небольшим овоидом и синтезирует несколько «пучков» пулевидных магнетосом. Штамм LBB_01 имеет вибриоидную форму и синтезирует 1 «пучок» пулевидных магнетосом. Таким образом, на основании филогеномного анализа и различий в морфологии клеток с ближайшими родственными

организмами штамм LBB_01 может быть определен как новый вид-кандидат, принадлежащий новому роду-кандидату в составе семейства ‘*Ca. Magnetobacteriaceae*’. Ему было предложено название ‘*Ca. Magnetomonas plexicatena*’.

9.5.3. Гены биоминерализации магнетосом.

В результате анализа генома LBB_01 были выявлены 17 белков биоминерализации магнетосом, которые были расположены в нескольких контигах (Рис. 29А, Таблица 13)

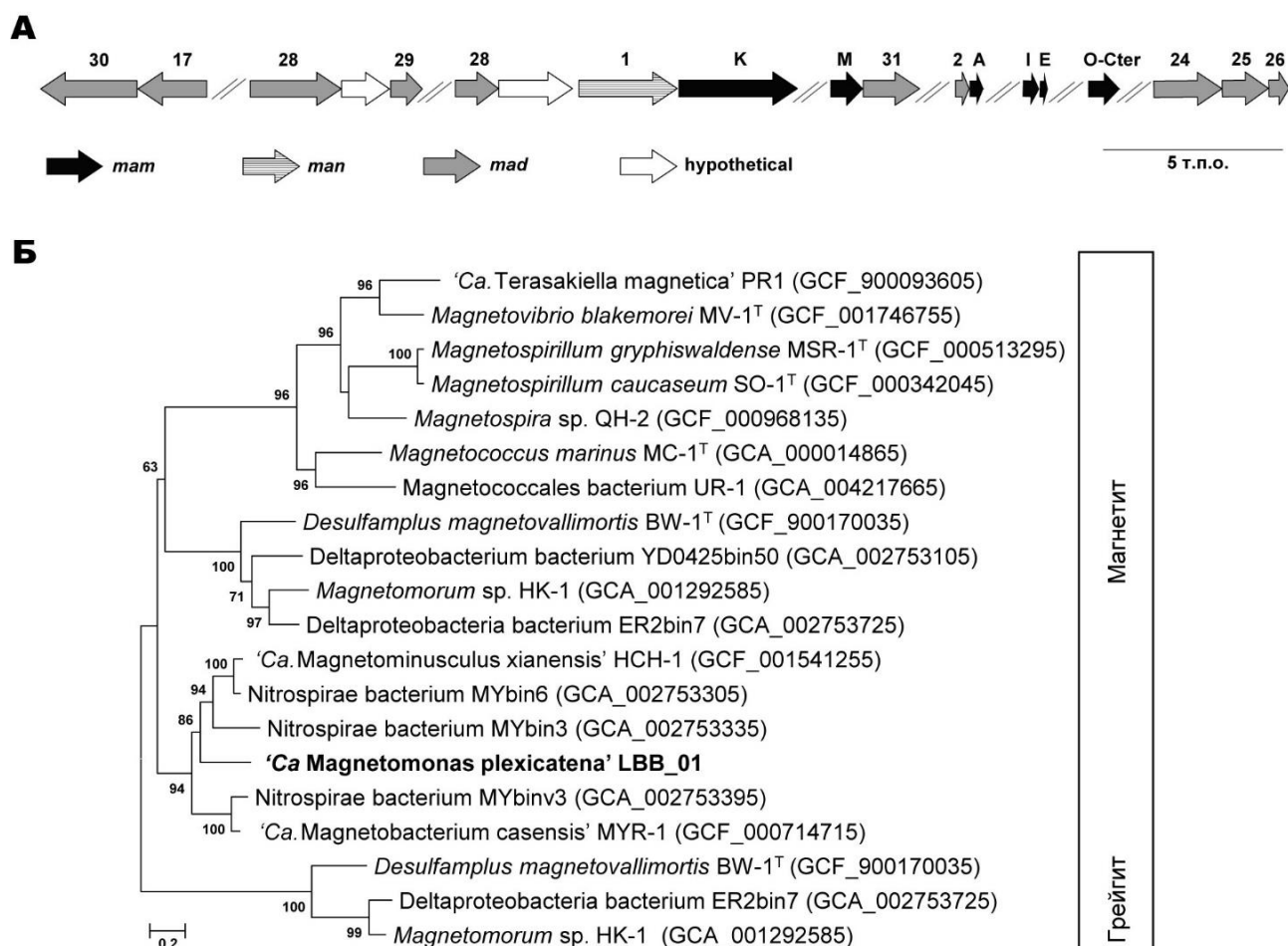


Рисунок 29. Анализ генов формирования магнетосом штамма LBB_01. А) Схематичное изображение организации магнетосомных генов. Б) Филогенетическое дерево, построенное на основе конкатенированных аминокислотных последовательностей белков (MamA-IKMP). Алгоритм maximum-likelihood, эволюционная модель LG+I+G4. Справа указан тип магнитного кристалла. Шкала, 0.2 замены на аминокислотную позицию.

Таблица 13 - Сравнение магнетосомных белков LBB_01 с таковыми у '*Ca.Magnetobacterium casensis*' MYR-1, '*Ca.Magnetoovum chiemensis*' CS-04 и, '*Ca.Magnetominusculus xianensis*' HCH-1.

Белок	Локус	'Ca.Magnetobacterium casensis' MYR-1		'Ca.Magnetoovum chiemensis' CS-04		'Ca.Magnetominusculus xianensis' HCH-1	
		Идентичность (%)	e-value	Идентичность (%)	e-value	Идентичность (%)	e-value
Mad30	E2O03 13010	57.1	2.00E-74	49.6	2.00E-64	56.3	2.00E-75
Mad17	E2O03 13005	49.1	0	50.2	0	56.3	0
Mad28	E2O03 12035	58.1	5.00E-138	52.0	8.00E-124	70.6	2.00E-148
Mad29	E2O03 12025	40.9	7.00E-65	50.7	9.00E-84	55.8	3.00E-93
Mad28	E2O03 10920	58.7	1.00E-138	50.2	4.00E-121	70.9	1.00E-148
Man1	E2O03 10930	34.3	6.00E-19	31.2	4.00E-15	37.4	5.00E-24
MamK	E2O03 10935	64.6	4.00E-64	55.1	9.00E-55	64.6	8.00E-62
MamM	E2O03 05430	59.1	7.00E-102	32.4	5.00E-43	66.7	2.00E-115
Mad31	E2O03 05435	47.8	2.00E-57	39.1	8.00E-39	59.5	3.00E-73
Mad2	E2O03 02385	37.3	4.00E-25	33.3	2.00E-19	58.1	9.00E-40
MamA	E2O03 02380	44.0	4.00E-28	39.8	2.00E-24	56.0	9.00E-38
MamI	E2O03 00725	56.9	4.00E-21	-	-	64.5	2.00E-22
MamE	E2O03 00720	54.8	6.00E-18	40.7	3.00E-13	54.6	8.00E-22
MamO-Cter	E2O03 06100	55.7	3.00E-92	25.4	8.00E-21	62.8	1.00E-109
Mad24	E2O03 06520	28.1	8.00E-22	34.3	6.00E-32	37.9	1.00E-34
Mad25	E2O03 06515	34.1	3.00E-27	30.8	8.00E-24	40.0	6.00E-39
Mad26	E2O03 06510	30	2.00E-25	27.0	5.00E-20	32.4	2.00E-28

Среди них были найдены несколько генов основного оперона *tamAB*, такие как *tamA*, *tamE*, *tamI*, *tamK*, *tamM* и *tamO-Cter*. Их сравнительный анализ показал, что наиболее сходными с ними являлись магнетосомные белки, принадлежащие представителям филума *Nitrospirae* (Таблица 13). Филогенетический анализ на основе конкатенированных аминокислотных последовательностей MamAIKMP показал, что LBB_01 кластеризовался вместе с последовательностями белков ‘*Ca. Magnetobacterium*’ и ‘*Ca. Magnetominusculus*’ (Рис. 29Б). Последовательности магнетосомных белков штамма LBB_01 так же, как и на филогеномном дереве, формировали отдельную ветвь. Сравнение топологии филогеномного дерева и дерева конкатенатов магнетосомных белков показало вероятность вертикального наследования МГО у штамма LBB_01.

Помимо основного оперона также были найдены 13 *mad* генов, характерных для магнитотактических *Deltaproteobacteria* и *Nitrospirae* (Lefèvre et al., 2013a). Три из них образовывали кластер, состоящий из генов *mad24*, *mad25* и *mad26*. Ген *mad28* был представлен в двух копиях. Также был найден ген *man1*, который характерен для МТБ филума *Nitrospirae* (Lin et al., 2014). Он находился рядом с *tamK*, что схоже с организацией магнетосомного острова у ‘*Ca. Magnetobacterium casensis*’ MYR-1. Опероны *tamGFDC*, *tamXY* and *mms6*, характерные для магнитотактических *Alphaproteobacteria*, не были обнаружены.

9.5.4. Описание нового вида-кандидата ‘*Ca. Magnetomonas plexicatena*’.

На основании филогенетического анализа и анализе морфологии было предложено выделить LBB_01 как новый род- и вид-кандидат внутри семейства ‘*Ca. Magnetobacteraceae*’. Ему были предложены следующие названия:

Candidatus Magnetomonas

Magnetomonas (Ma.gne.to.mo'nas. Gr. n. magnes, -etos магнит; N.L. pref. magneto- относящийся к магниту; N L. fem. n. monas unit, монада; N.L. fem. n. *Magnetomonas* магнитная монада).

Candidatus Magnetomonas plexicatena

Magnetomonas plexicatena (ple.xi.ca.te'na. L. past part. *plexus* переплетенный; L. fem. n. *catena* цепь; N.L. fem. n. *plexicatena* переплетенная цепь).

Клетки вибриоидной формы 2.0 ± 0.4 мкм в длину и 0.5 ± 0.1 мкм ширину. Содержат 33 ± 9 анизотропных пулевидных магнетосом размером 108 ± 21.1 нм в длину и 45 ± 8.1 нм в ширину. Магнетосомы состоят из магнетита и организованы в виде одного «пучка». Кончики магнетосом не всегда ориентированы в одну сторону.

ГЛАВА 10 ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПИСАНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ.

10.1. Выделение чистых культур МТБ.

10.1.1. Выделение чистой культуры МТБ из реки Москва.

После сепарирования магнитотактических бактерий из микрокосма и последующей стадии магнитной сепарации с помощью метода магнитной сепарации в капилляре «race-track», клетки засеивали в полужидкие среды. В качестве среды для получения накопительной культуры была использована среда DSM 380 для *Magnetospirillum*. После установления градиента кислорода, среда была засеяна очищенными клетками МТБ с помощью пипетки Пастера. После месяца культивирования рост проявился в виде колец в микроаэрофильной зоне на расстоянии 0.5-1.0 см от газовой фазы. Микроскопические исследования показали наличие гомогенной культуры бактерий спиральной формы. Для получения чистой культуры был произведен рассев на твердую модифицированную среду АСАМ. Чашки инкубировали в анаэробном состоянии в микроаэрофильных условиях (99% азота и 1% кислорода). После 14 дней инкубирования рост проявился в виде маленьких колоний белого или кремового цвета, которые затем перенесли в полужидкие среды DSM 380. На фотографии, полученной с помощью ПЭМ, видно, что клетки имели два полярных жгутика и содержали единственную цепочку магнетосом. Выделенный штамм был обозначен как ВВ-1

10.1.2. Выделение чистой культуры из озера Белое Бордуковское.

Клетки из микрокосма получали описанным выше способом и засеивали полужидкую среду MSGM. После двух недель инкубирования накопительной культуры проявился рост у дна пробирки в виде отдельных колоний. При световой микроскопии этих колоний были обнаружены клетки спиралл,

проявляющие магнитотаксис. Для выделения чистой культуры отбирали отдельную колонию с помощью пипетки Пастера, проводили магнитную сепарацию в капилляре «race-track» и засеивали среду MSGM. Выросшую культуру дополнительно подвергали серии последовательных разведений на среде MSGM. Выделенный штамм был обозначен как LBB-42.

10.2. Морфология выделенных штаммов.

Клетки выделенных штаммов имели форму спирилл. Размеры клеток штамма BB-1 составляли $0.3 \times 2.0\text{--}4.0$ мкм, размеры штамма LBB-42 составляли $2.7 \pm 0.94 \times 0.5 \pm 0.08$ мкм. Клетки имели по 1 жгутику на обоих концах клетки и проявляли магнитотаксис. Штаммы синтезировали единственную цепочку магнетосом, среднее количество которых составляло около 15 штук на клетку (Рис. 30А, Б). ПЭМ ВР показала, что магнетосомы состояли из магнетита и имели кубookтаэдрическую форму (Рис. 30В, Г).

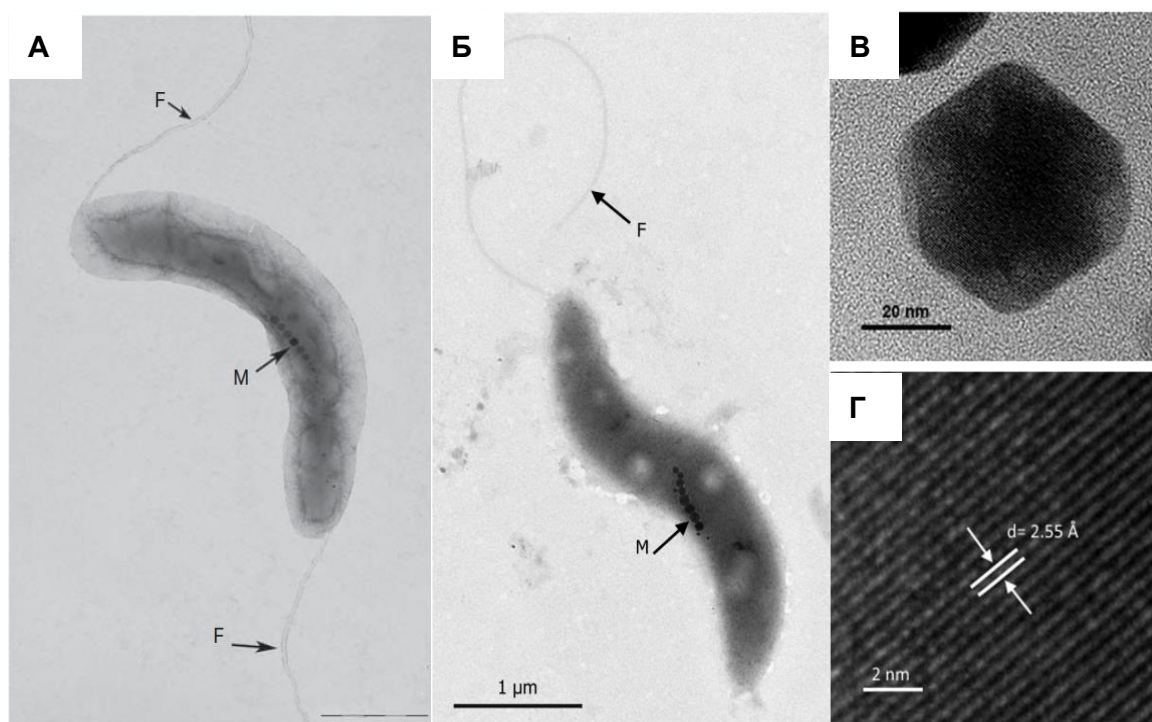


Рисунок 30. Просвечивающая электронная микроскопия выделенных штаммов и их магнетосом. А) клетка штамма BB-1, Б) Клетка штамма LBB-42, В, Г) ПЭМ ВР магнетосомы штамма LBB-42. М, магнетосомы; F, флагеллы.

10.3. Филогенетический анализ.

Филогенетический анализ, основанный на последовательностях гена 16S рРНК, был проведен с использованием алгоритмов maximum likelihood, neighbour-joining и maximum-parsimony. В результате, филогенетический анализ показал, что новые штаммы принадлежали семейству *Rhodospirillaceae* класса *Alphaproteobacteria* (Рис. 31).

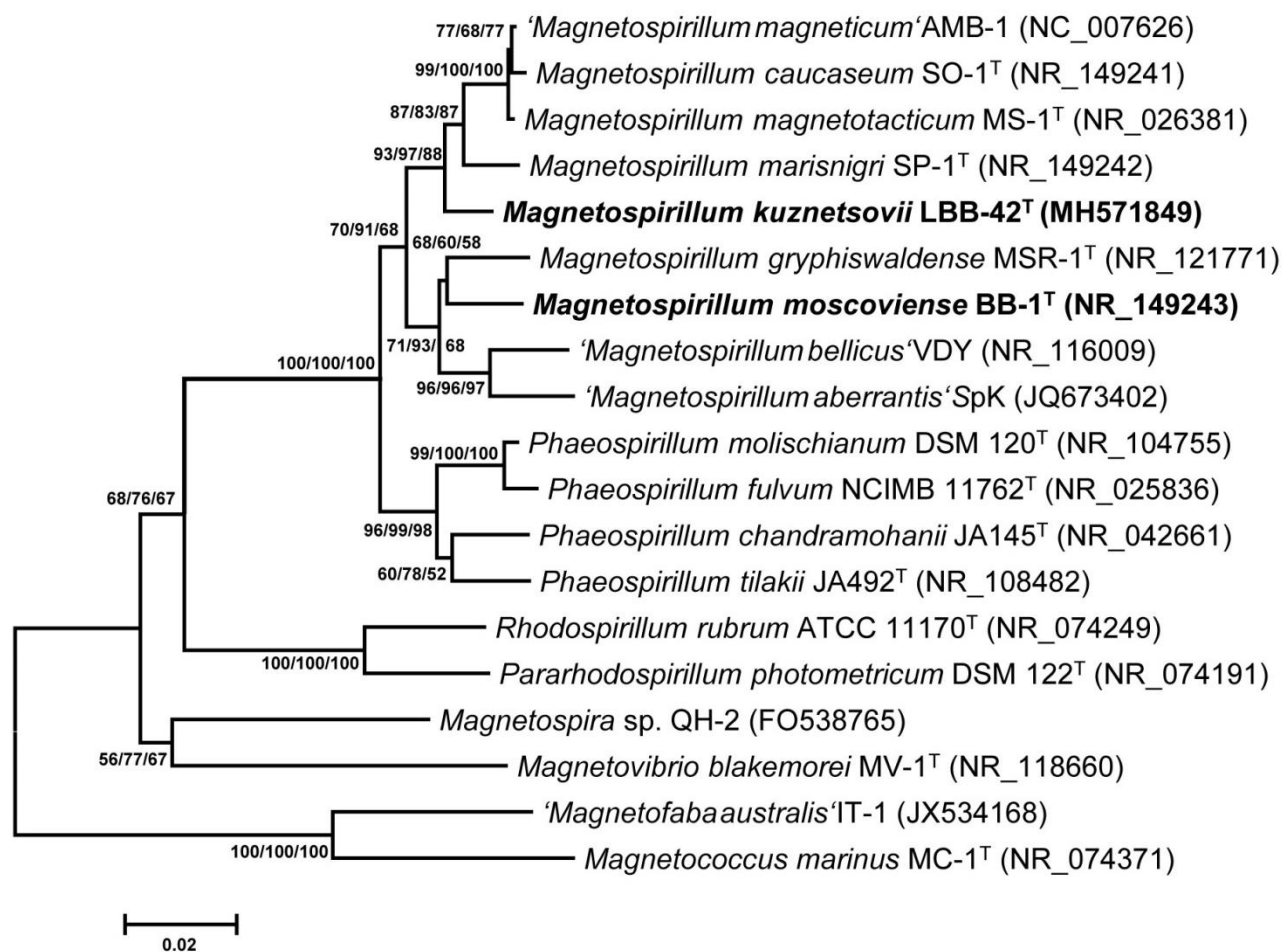


Рисунок 31. Филогенетическое дерево, построенное на основе полных последовательностей гена 16S рРНК представителей семейства *Rhodospirillaceae*. Значения «bootstrap»-анализа показаны, слева направо, для деревьев, построенных с помощью алгоритмов maximum likelihood, neighbour-joining, и maximum parsimony для одного и того же набора последовательностей. Штаммы MC-1^T и IT-1 класса *'Ca. Etaproteobacteria'* использованы в качестве внешней группы. Шкала, 0.01 замена на нуклеотидную позицию.

На филогенетическом дереве, построенном на основании последовательностей гена 16S рРНК новых штаммов и имеющихся в GenBank

последовательностей, штамм BB-1 формировал кластер вместе с валидно описанным штаммом *Ms. gryphiswaldense* MSR-1^T (97.3% сходства). В то время как последовательность штамма LBB-42 формировала отдельную ветвь внутри рода *Magnetospirillum*. Наиболее близким к нему был штамм *Ms. marisnigri* SP-1^T, уровень сходства с ним составил 98.1%. Таким образом, правомерно определить таксономическое положение выделенных штаммов как новые виды рода *Magnetospirillum*. Последовательности гена 16S рРНК штаммов BB-1 и LBB-42 были депонированы в GenBank под номерами NR_149243 и MH571849, соответственно.

10.4. Определение физиологических характеристик выделенных штаммов.

Исследуемые микроорганизмы имели гетеротрофный тип метаболизма, как и все представители рода *Magnetospirillum*. Штаммы BB-1 и LBB-42 также как и все представители своего рода способны ассимилировать ацетат, малат, пируват, лактат, сукцинат и не способны утилизировать сахара, этанол и цитрат. Штамм BB-1 может расти на тартрате, глицероле и пропионате, но не на тиосульфате, по сравнению с ближайшим культивируемым штаммом *Ms. gryphiswaldense* MSR-1^T. Штамм LBB-42 не способен использовать тартрат, пропионат, бутират и глицерол, в отличие от BB-1 и некоторых других *Magnetospirillum*. В качестве акцептора электронов для обоих штаммов выступали кислород и нитрат, но не сульфат, нитрит и перхлорат. Основные дифференцирующие характеристики выделенных штаммов и типовых представителей рода *Magnetospirillum* приведены в Таблице 14.

Штамм BB-1 показал толерантность к NaCl при концентрации не более 1%. Штамм LBB-42 показал низкую толерантность к NaCl (<0,1%), также как и ближайший к нему штамм SP-1^T.

В полужидкой среде штаммы формировали кольцо на глубине около 2 см от газовой фазы, что говорит о микроаэрофильном характере их роста. Однако толерантность к содержанию кислорода в газовой фазе варьирует среди представителей рода *Magnetospirillum*. Рост LBB-42 проявлял при 0 – 16% кислорода, не проявлял при полной аэрации в присутствии и без тиогликолята

натрия. Тем самым, он значительно отличался от наиболее близкого штамма SP-1^T, который показывал наименьшую толерантность (не более 5% кислорода в газовой фазе). В то время как штамм ВВ-1 мог расти и при свободном газообмене между воздухом и средой в присутствии тиогликолята, хотя скорость роста значительно снижалась, и в этих условиях клетки не продуцировали магнетосомы. У обеих бактерий отсутствовала каталазная активность; у ВВ-1 оксидазная активность присутствовала, а у LBB-42 - нет.

Таблица 14 - Основные характеристики штаммов *Magnetospirillum* spp.

Характеристика	LBB-42	SP-1 ^T	SO-1 ^T	MS-1 ^T	AMB-1	MSR-1 ^T	ВВ-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)	- (7.0–7.5)	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 †	++	+	++	+	+++	+++	++
Ассимиляция субстратов:							
Тартрат	-	+	+	+	+	-	+
Пропионат	-	+	+	-	НД	-	+
Бутират	-	+	+	-	+	+	+
Глицерол	-	-	+	-	-	-	+
Тиосульфат	-	-	-	-	НД	+	-

+, утилизируют; -, не утилизируют; 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

Клетки ВВ-1 развивались в диапазоне температур 18 – 38 °С, оптимум роста при 25 – 32°С. Наилучший рост наблюдали при рН 6.5 – 7.0. Штамм LBB-42 рос при 22 – 33 °С с оптимумом в 30 °С. Значения рН, при которых развивался рост, варьировали от 5.75 до 8.0 с оптимумом 5.9 – 6.7.

Способность к азотфиксации была определена с помощью ацетиленового метода. Было показано, что штамм ВВ-1 имеет способность к фиксации атмосферного азота в гетеротрофных условиях. Активность нитрогеназы составила 1.13 ± 0.17 нМ (C₂H₄)·мин⁻¹·мг⁻¹клеточного белка. В присутствие растворенного источника азота, нитрата натрия, активность нитрогеназы составляла 0.15 ± 0.068 нМ (C₂H₄)·мин⁻¹·мг⁻¹клеточного белка.

10.5. Хемотаксономический анализ.

Состав жирных кислот (ЖК) для выделенных бактерий близок к таковому у других представителей рода *Magnetospirillum* (Таблице 15).

Таблица 15 - Состав жирных кислот у *Magnetospirillum* spp. В таблице приведены значения больше 0.2%. Основные ЖК выделены жирным шрифтом

ЖК	ВВ-1	LBB-42	SP-1 ^T	SO-1 ^T	MS-1 ^T	AMB-1	MSR-1 ^T
C12:0	1.1	-	0.6	1.1	0.7	0.9	1.7
C14:0	0.7	0.1	0.6	0.9	0.6	0.6	2.7
C15:0	1.1	-	-	0.2	0.4	-	-
C16:0	19.3	12.5	10.9	20.6	19.1	18.1	13.4
C17:0	0.8	-	0.3	0.6	0.2	0.2	0.2
C18:0	11.6	0.7	16.2	12.3	18.3	8.6	10.3
C20:0	-	-	0.2	-	0.2	-	-
C14:1 _ω 5	0.2	-	-	-	-	-	-
C17:1 _ω 8	0.7	-	-	-	-	-	-
C16:1 _ω 7 _c	25.4	30.9	24.7	28.3	25.1	24.2	22.8
C16:1 _ω 9	-	-	0.4	0.4	0.3	0.5	-
C18:1 _ω 7/C18:1 _ω 9	37.5	55.4	45.8	36.1	35.1	32.1	46.8
C14:0 3-OH	0.2	0.3	0.2	-	-	-	0.2
C17 : 0 cyclo	1.3	-	-	-	-	-	-
C19 : 0 cyclo	-	-	-	-	-	-	1.9
iso-C14 : 0	-	-	-	-	-	0.2	-
iso-C15 : 0	-	-	-	-	-	0.4	-
anteiso-C15 : 0	-	-	-	-	-	7.4	-
iso-C16 : 0	-	-	-	-	-	3.9	-
anteiso-C17 : 0	-	-	-	-	-	2.6	-

Основными жирными кислотами были C16:1_ω7_c, C16:0 и C18:1_ω9\ C18:1_ω7. Кислота C18:0, которая является одной из основных у большинства членов рода *Magnetospirillum*, в том числе и у штамма BB-1, у штамма LBB-42 имела низкое содержание.

10.6. Секвенирование и анализ геномов штаммов BB-1 и LBB-42.

Были определены нуклеотидные последовательности геномов штаммов LBB-42 и BB-1. Для LBB-42 было получено 70 контигов общим размером 4,411,256 п.о. Нуклеотидная последовательность генома BB-1 составляла 4,164,497 п.о. заключенных в 207 контигов. G+C состав составил 63.4% для LBB-42 и 65.2% для BB-1, что является близким по значению с другими штаммами рода *Magnetospirillum*. Обзор геномов рода *Magnetospirillum*, которые были использованы для сравнения, приведен в Таблице 16.

Таблица 16 - Данные о геномах *Magnetospirillum* spp.

Штамм	Размер генома (Mbp)	Кол-во скаффолдов	G+C состав (%)	Номер в GenBank
BB-1	4164497	207	65.2	NZ_LWQU000000000
LBB-42	4411256	69	63.4	PGTO000000000
SP-1 ^T	4619819	131	63.0	NZ_LWQT000000000
SO-1 ^T	4874084	261	66.0	NZ_AONQ000000000
MS-1 ^T	4523935	36	63.5	NZ_JXSL000000000
AMB-1	4967148	1	65.09	NC_007626
MSR-1 ^T	4365796	1	63.28	CP027526

На основе полученной нуклеотидной последовательности были рассчитаны ANI и dDDH между типовыми представителями рода *Magnetospirillum*. Значения ANI и dDDH для LBB-42 и ближайшего штамма SP-1^T составил 83.1 и 25.1%, соответственно. Между штаммами BB-1 и MSR-1^T

значения dDDH и ANI составили 40.5% и 80.7%, соответственно. Полученные значения для обоих штаммов были ниже порогов разделения видов (95% для ANI и 70% для dDDH), что позволило отнести штаммы LBB-42 и BB-1 к новым видам рода *Magnetospirillum*. Данные ANI и dDDH представлены в Таблице 17. Геномные последовательности LBB-42 и BB-1 были депонированы в GenBank под номерами PGTO000000000 и LWQU000000000 соответственно.

Таблица 17 - Значения ANI и dDDH между *Magnetospirillum* spp.

		ANI						
Штаммы		1	2	3	4	5	6	7
1	LBB-42	100	81.4	81.9	81.8	83.1	78.3	78.7
2	MS-1 ^T	23.0	100	85.6	86.6	82.1	79.0	78.7
3	SO-1 ^T	23,6	30.3	100	87.3	82.7	79.3	79.7
4	AMB-1	23.4	32.2	33.6	100	82.7	79.2	79.4
5	SP-1 ^T	25.2	23.7	24.4	24.3	100	78.9	78.8
6	MSR-1 ^T	19.9	20.3	20.7	20.5	20.3	100	80.7
7	BB-1^T	20.3	20.1	20.9	20.7	20.6	21.7	100
		dDDH						

10.7. Филогенетический анализ генов формирования магнетосом.

В геномах BB-1 и LBB-42 были определены специфичные для МТБ гены биоминерализации магнетосом. Были идентифицированы все 5 оперонов, обычно присутствующих в геномах *Magnetospirillum* (Рис. 32). Филогенетическое дерево, построенное на основе конкатенированных аминокислотных последовательностей белков MamABKMPQ было конгруэнтно дереву, построенному на основе последовательностей гена 16S рРНК, что говорит о вертикальном наследовании этих генов (Рис. 33).

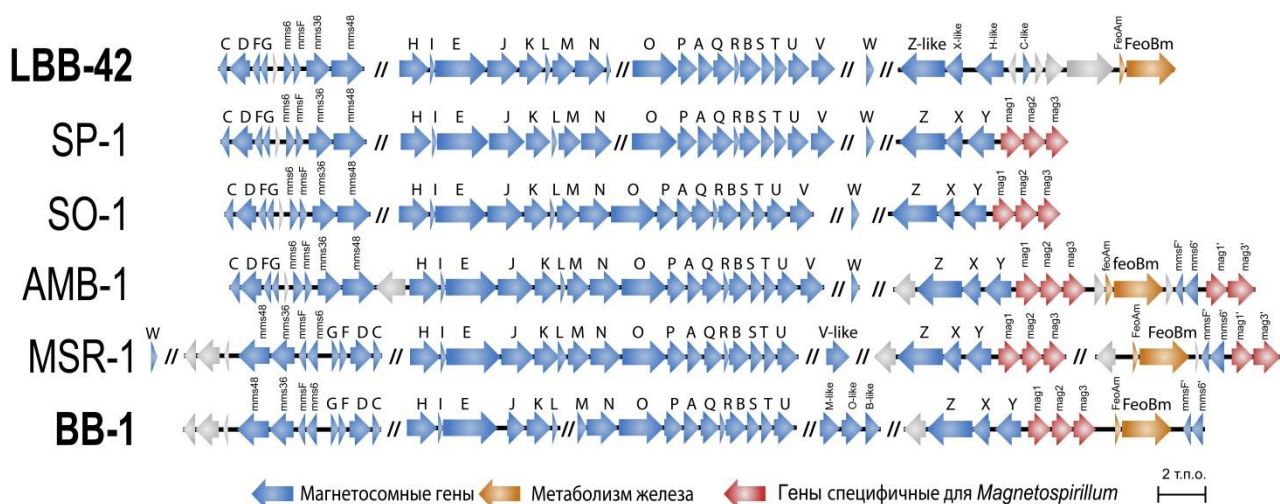


Рисунок 32. Организация МГО у *Magnetospirillum* spp.

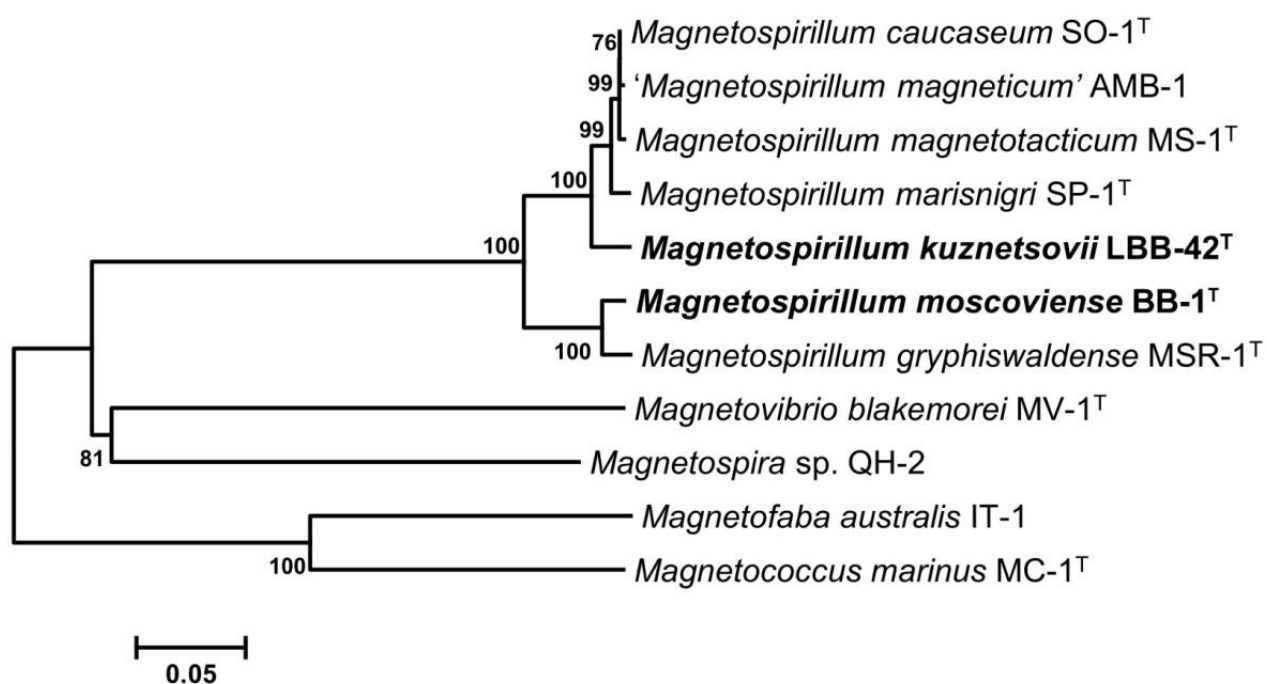


Рисунок 33. Филогенетическое дерево, построенное на основе конкатенированных аминокислотных последовательностей белков MatABKMPQ (1710 ак) связанных с синтезом магнетосом. Числа указывают значения «bootstrap»- анализа (1000 альтернативных деревьев) с помощью алгоритма neighbour-joining. Шкала, 0.05 замен на аминокислотную позицию.

В отличие от других *Magnetospirillum*, штамм LBB-42 содержит дополнительный оперон, содержащий гены *tamXZ* и *feoAB*, кодирующие белки, которые имеют высокую аминокислотную идентичность (до 98% и 93% соответственно) с таковыми у *Magnetospirillum* (Рис. 34, Таблица 18).

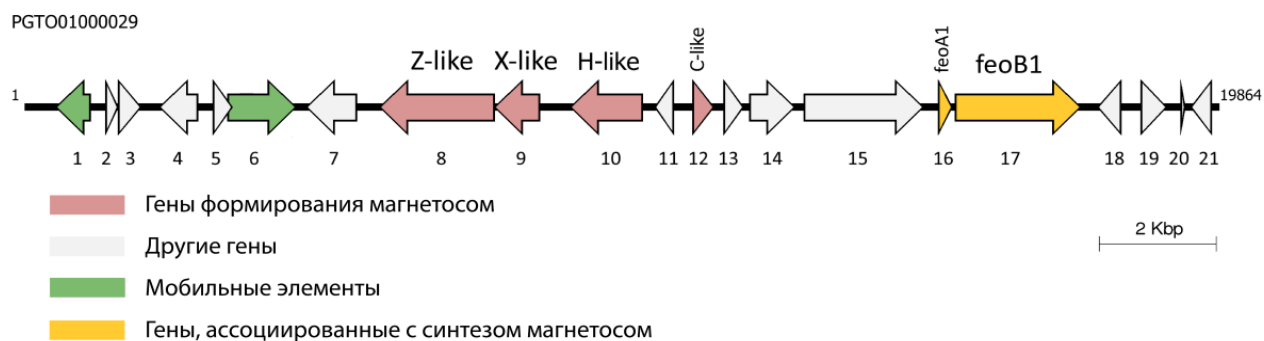


Рисунок 34. Регион генома LBB-42, содержащий дополнительные гены, которые предположительно вовлечены в синтез магнетосом. Номера под стрелками обозначают порядок в таблице 18.

Известно, что МГО может подвергаться перестройкам, делециям и дупликациям (Fukuda et al., 2006; Monteil et al., 2018; Ullrich et al., 2005). В геноме LBB-42^T были обнаружены гены, кодирующие транспозазы и интегразы, что может указывать на то, что появление этих дополнительных магнетосомных генов является результатом внутренних перестроек или приобретением от других МТБ. Чтобы выяснить возможное происхождение этих генов, был проведен филогенетический анализ на основе аминокислотных последовательностей (Рис. 35).

Таблица 18 - Список белков, кодируемых генами, которые представлены на рисунке 34. Строки окрашены в той же манере, как и на рисунке 34.

Дополнительный МГО у LBB-42 ^T			Результаты BLAST			
Номер на Рис.34	Номер	Предполагаемая функция	Бактерия с наивысшим уровнем сходства	Покрытие	Идентичность	Номер
1	WP_112147250	Сайт-специфичная интеграза	<i>Azospirillum</i> sp. CFH 70021	98%	61%	WP_109326783
2	WP_112147251	AbrB/MazE/SpoVT	<i>Niveispirillum irakense</i> DSM 11586	100%	49%	WP_051329918
3	WP_112147252	Белок, содержащий домен PIN	<i>Rhodospirillales</i> bacterium 20-64-7	98%	56%	OYV35002
4	WP_112147253	Гипотетический белок	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1	64%	81%	AVM76242
5	WP_112147254	Гипотетический белок	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1	76%	75%	AVM76242
6	WP_112147255	IS66 транспозаза	<i>Desulfobacter vibrioformis</i> DSM 8776	90%	59%	WP_035239299
7	WP_112147256	Гипотетический белок	<i>Ca. Magnetominusculus xianensis</i> HCH-1	76%	36%	KWT78335
8	WP_112147280	MFS транспортер (MamZ-like)	<i>Magnetospirillum moscoviense</i> BB-1	100%	98%	WP_068503452
9	WP_112147281	Гистидинкиназа (MamX-like)	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1	100%	95%	WP_041634407
10	WP_112147282	MFS транспортер (MamH-like)	<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1	94%	57%	BAE49765
11	WP_112147257	Гипотетический белок	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1	78%	76%	WP_041633584
12	WP_112147258	MamC-like	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1	98%	58%	WP_106001323
13	WP_112147259	Гипотетический белок	<i>Magnetospirillum caucaseum</i> SO-1	99%	78%	EME68564
14	WP_112147260	Белок, содержащий домен DUF2202	<i>Magnetospira</i> sp. QH-2	86%	49%	CCQ75410
15	WP_112147261	Гипотетический белок	<i>Rhodoplanes roseus</i> DSM 5909	98%	50%	WP_111419403
16	-	Транспортер железа (II) FeoA1	<i>Magnetospirillum marisnigri</i> SP-1	100%	94%	WP_082914977
17	WP_112147262	Транспортер железа (II) FeoB1	<i>Magnetospirillum caucaseum</i> SO-1	100%	93%	WP_008615050
18	WP_112147263	белок, содержащий домен DUF2202	<i>Magnetospirillum</i> sp. 64-120	61%	65%	OJX65809
19	WP_112147264	Гемэритрин	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1	87%	50%	WP_009865709
20	WP_112147283	Гипотетический белок	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1	100%	89%	CAM77523
21	WP_112147265	Роданаза	<i>Phaeospirillum molischianum</i> DSM 120	99%	70%	WP_002726669

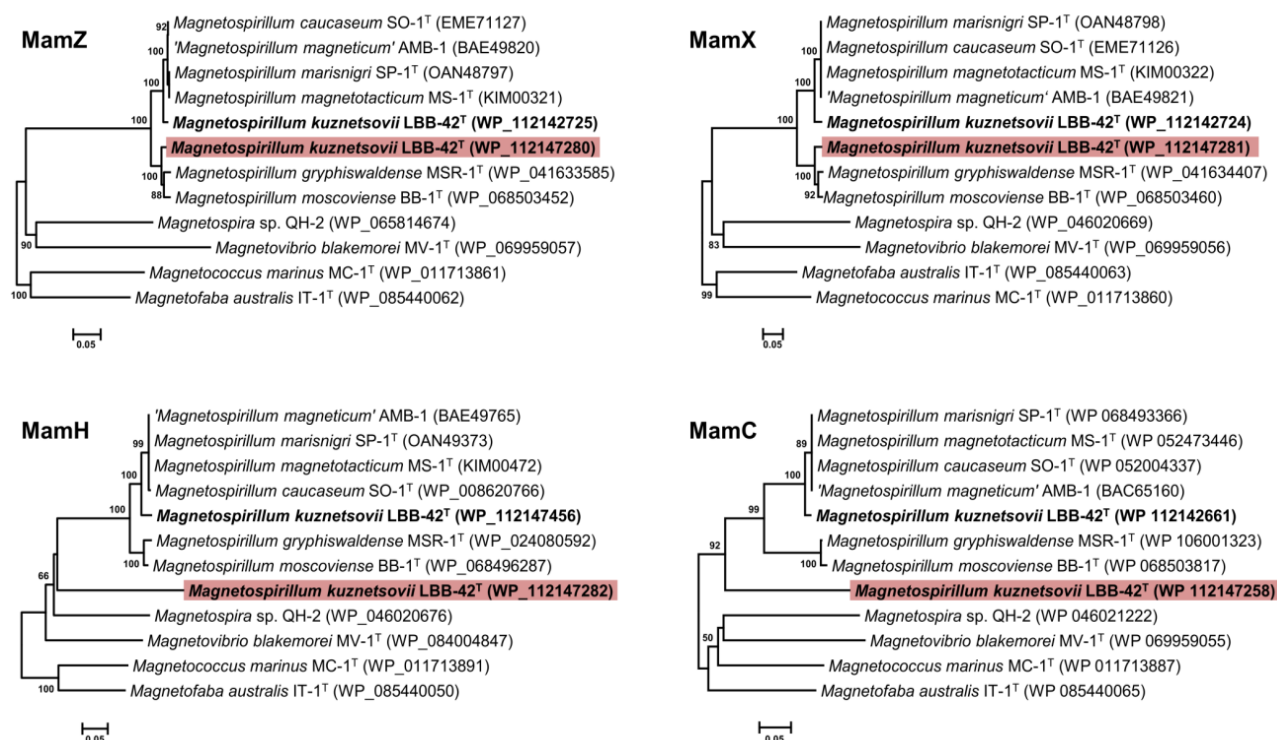


Рисунок 35. Филогенетические деревья, построенные на основе аминокислотных последовательностей белков MamX, MamZ, MamH и MamC. Числа указывают значения «bootstrap»-анализа с помощью алгоритма neighbour-joining. Последовательность штамма LBB-42^T указана жирным шрифтом. Дополнительные белки штамма LBB-42 выделены цветом. Шкала, 0.05 замен на аминокислотную позицию.

Последовательности белков MamZ-like и MamX-like штамма LBB-42 на филогенетическом древе кластеризовались с последовательностями штаммов MSR-1^T и BB-1. Последовательности MamC-like и MamH-like образовывали отдельные клады на филогенетических деревьях. Таким образом, на основании филогенетического анализа можно предположить, что эти дополнительные гены были результатом горизонтального переноса от других МТБ.

Геномы видов *Magnetospirillum* обычно содержат две системы переноса двухвалентного железа, *feoAB1* и *feoAB2*. Ранее было показано, что FeoAB1 участвует в образовании магнетосом, в то время как FeoAB2 является частью общего метаболизма железа в клетках. Был проведен филогенетический анализ на основе аминокислотных последовательностей белка FeoB. В результате было обнаружено, что оба белка FeoB штамма LBB-42 принадлежат к системе FeoAB1, связанной с образованием магнетосом (Рис. 36).

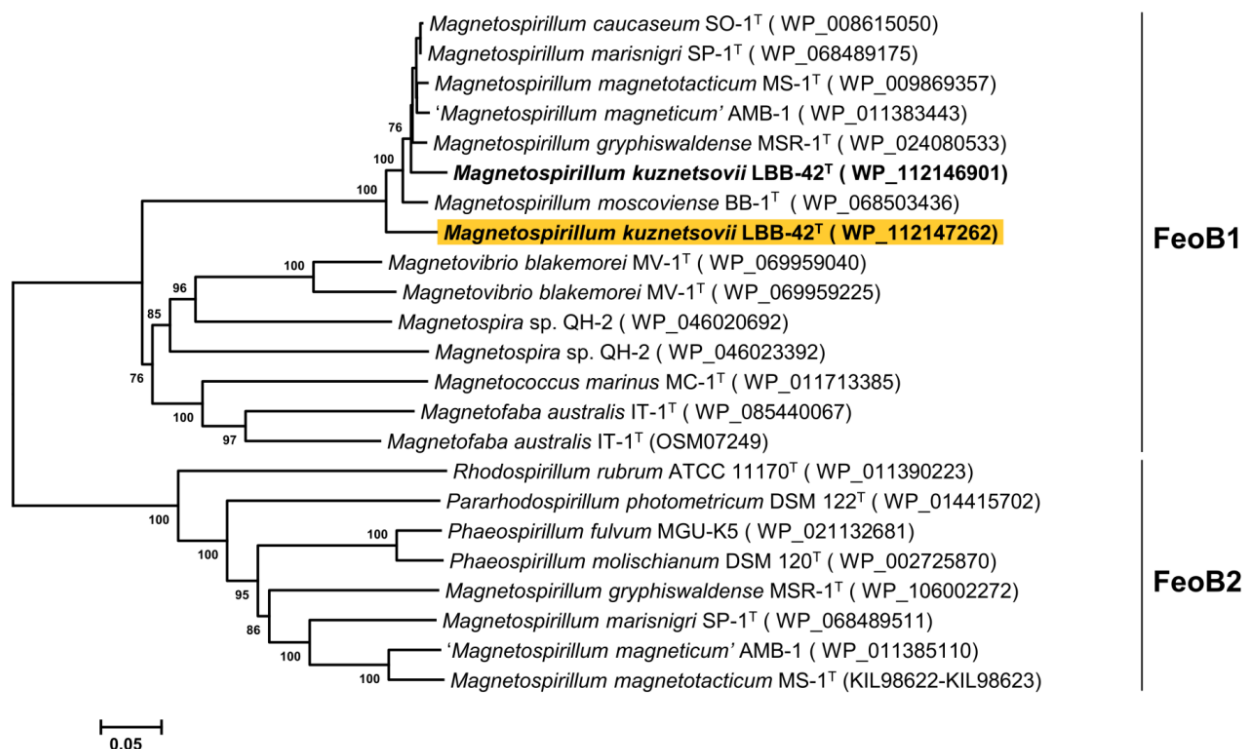


Рисунок 36. Филогенетическое дерево, построенное на основе аминокислотных последовательностей белка FeoB. Числа указывают значения «bootstrap»-анализа с помощью алгоритма neighbour-joining. Последовательность штамма LBB-42^T указана жирным шрифтом. Дополнительные белки штамма LBB-42^T выделены цветом. Шкала, 0.05 замен на аминокислотную позицию.

Стоит отметить, что гены *feoAB2* отсутствовали в геноме LBB-42^T. Возможно, наличие только генов *feoAB1* является достаточным для транспорта железа для этого штамма.

Штаммы BB-1 и LBB-42 могут быть отделены от типовых штаммов *Magnetospirillum* на основании данных анализа полной последовательности генома. Попарные значения индексов ANI и dDDH свидетельствуют о том, что штаммы не принадлежат ни одному из валидно описанных видов. Разделение штамма LBB-42 с типовыми представителями рода *Magnetospirillum* возможно благодаря низкому содержанию кислоты 18:0, в то время как у всех остальных она является доминирующей. Штаммы имеют некоторые отличия и по своим фенотипическим свойствам с наиболее близкими видами. Оптимум pH для LBB-42 ниже обычного для данного рода значения 6.7-7.0, он использует наиболее узкий спектр карбоновых кислот. По сравнению наиболее близким

штаммом SP-1^T штамм проявляет наибольшую толерантность к кислороду. Штамм ВВ-1 проявляет меньшую толерантность к кислороду и способен утилизировать глицерол, пропионат и тартрат, по сравнению с MSR-1^T. Вследствие этого, правомерно определить выделенные штаммы ВВ-1 и LBB-42 как новые виды рода *Magnetospirillum*.

10.8. 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, может расти в жидкой среде при полной аэрации в присутствии тиогликолята, факультативный анаэроб. Каталаза-отрицательный, оксидаза-положительный. Хемоорганогетеротроф. Бактерия растет в диапазоне температур от 20 до 45°C с оптимальным ростом при 25-32°C. Наилучший рост 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_ω7/C18:1_ω9 – 37.5%; 16:1_ω7с – 25.4%; 16:0 – 19.3%; 18:0 – 11.6%. Содержание G+C - 65.2%.

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

10.9. Характеристика *Magnetospirillum kuznetsovii* sp. nov.

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

Клетки спирилловидной формы, 2.7 ± 0.94 мкм в длину и 0.5 ± 0.08 мкм в ширину, подвижны, биполярное жгутикование, содержат 1 цепочку кубооктаэдрических магнетосом. Наилучший рост при 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, этанол, тиосульфат и глицерол. Не проявляет оксидазной и каталазной активностей. Доминирующие жирные кислоты: $C_{16:1\omega 7s}$, $C_{16:0}$ и $C_{18:1\omega 9}/C_{18:1\omega 7}$. G+C состав – 63.4%.

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; =KСТС 15749^T).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интенсивные исследования разнообразия МТБ, проводившиеся различными научными коллективами, показали широкое распространение бактерий этой группы по всему миру в пресноводных и морских осадках. В результате анализа последовательностей гена 16S рРНК, было установлено наличие МТБ порядков *Rhodospirillales* и *Magnetococcales* в пробах из р. Москва и р. Уда. В обоих случаях кокки порядка *Magnetococcales* значительно доминировали. Такой результат может быть связан с избирательностью метода магнитной сепарации в капилляре («race-track»), который был использован для извлечения 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 (МТВ-CoSe). Также была сконструирована система праймеров на маркерный ген *tamK* МТБ. Комбинацией этих методов было определено разнообразие МТБ в оз. Белое Бордуковское. В результате были выявлены несколько групп МТБ, принадлежащих филуму *Nitrospirae*. Впервые были идентифицированы МТБ семейства *Syntrophaceae*. Определена морфология клеток и магнетосом бактерий обнаруженных филогенетических групп и доказана их принадлежность к МТБ. В результате геномного анализа и анализа морфологии был предложен новый род- и вид-кандидат филума *Nitrospirae* – ‘*Ca. Magnetomonas plexicatena*’. Разработанные в ходе работы метод МТВ-CoSe и праймерная система на ген *tamK* могут использоваться для идентификации МТБ с низкой численностью микроорганизмов. Предлагаемые методы могут быть использованы для выявления магнитотактических представителей филумов ‘*Latescibacteria*’ и *Planctomycetes*, морфология магнетосом которых еще не определена.

Было обнаружено доминирование МТБ филума *Nitrospirae* в образцах из оз. Белое Бордуковское. Полученный нами результат является необычным, поскольку согласно литературным данным в большинстве случаев было

показано превалирование МТБ классов *Alphaproteobacteria* и ‘*Ca. Etaproteobacteria*’. Этому может быть несколько объяснений. Во-первых, полученный результат может быть связан с процедурой магнитной сепарации МТБ из микрокосма. Вероятно, первоначальный сбор на магнит и обогащение в капилляре «race-track», которые используют в подавляющем количестве исследований, дают преимущество наиболее мобильным клеткам МТБ. Кроме того, интенсивность приложенного магнитного поля, расстояние до магнита и аэротаксис могут оказывать влияние на эффективность сепарации, основанной на магнитотаксисе. Предложенный нами метод МТБ-CoSe, вероятно, может давать преимущество клеткам МТБ с большим содержанием магнетосом, какими и являются представители филума *Nitrospirae*. Во-вторых, не исключается возможность существования оптимальных для *Nitrospirae* условий роста во время отбора их из микрокосма, так как ранее была показана смена состава сообществ МТБ в течение долговременных наблюдений за микрокосмами (Flies, Peplies, Schüller, 2005).

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. В результате анализа морфологии с помощью ПЭМ, было показано, что штамм UR-1 синтезирует неорганизованные в цепочки магнетосомы.

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. По результатам проведенного геномного анализа предложены пороги разделения таксонов на

уровне семейства (AAI < 55-56%) и рода (AAI < 64-65%) для класса 'Ca. Etaproteobacteria'.

Согласно литературным данным, магнетосомный остров *Mc. marinus* MC-1^T не подвержен перестройкам, также гены формирования магнетосом обоих культивируемых штаммов *Magnetococcales*, MC-1^T и IT-1, имели вертикальное наследование (Morillo et al., 2014). По результатам филогенетического анализа магнетосомных и коровых белков генома была выявлена неколлинеарность полученных филогенетических деревьев. Кроме этого был обнаружен необычно высокий уровень сходства (95-100%) магнетосомных белков у близкородственных штаммов UR-1 и WMHbinv6. Поскольку такая особенность магнетосомных белков никогда не наблюдалась, и это противоречило бы большому количеству данных об их эволюции, полученные результаты говорят о том, что МГО у UR-1 и WMHbinv6 мог быть приобретен вследствие горизонтально переноса либо между этими двумя видами, либо от другого близкородственного штамма. Таким образом, впервые была показана возможность горизонтального переноса магнетосомных генов у представителей порядка *Magnetococcales*, как между близкородственными видами, так и представителями более высоких рангов. Кроме этого, штаммы HCHbin5 и UR-1 несмотря на то, что относятся к одному и тому же роду, имеют разное строение магнетосомных островов и низкий уровень сходства магнетосомных белков, что возможно, может говорить о разнице в строении магнетосомных цепей. 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, 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, Pan, 2009).

Показанная нами возможность горизонтального переноса внутри порядка *Magnetococcales* может служить объяснением этому предположению.

В результате проведенного анализа были показаны различия генетических детерминант путей диссимиляционного окисления серных соединений у штамма UR-1 и его близкородственных штаммов в сравнении с морскими представителями MC-1^T, MO-1, и IT-1. У морских штаммов наиболее вероятно функционирует rDsrAB и SOX-комплекс, в то время как у пресноводных штаммов, возможно, функционирует rDsrAB и АФС редуктаза. Сравнительный геномный анализ, проведенный в настоящем исследовании, пролил свет на потенциальные метаболические способности штамма UR-1 как представителя семейства 'Ca. Magnetaquificoccales'. Предсказанные особенности, например потенциальная способность к хемолитоавтотрофному росту с восстановленными соединениями серы, нитратное дыхание с возможным накоплением токсичного оксида азота и ожидаемая относительно высокая толерантность к кислороду могут быть полезными при выделении чистых культур штамма UR-1 и родственных кокков.

В результате проведенной работы были выделены в чистую культуру и описаны новые виды МТБ – *Magnetospirillum moscoviense* BB-1^T из р. Москва и *Magnetospirillum kuznetsovii* LBB-42^T из оз. Белое Бордуковское. В результате филогенетического анализа магнетосомных генов было показано их вертикальное наследование. Кроме пяти основных оперонов МГО в геноме LBB-42 были обнаружены дополнительные магнетосомные гены, расположенные вне острова. Эти дополнительные гены, возможно, возникли в результате горизонтального переноса от других 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 *tamK*. 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 СОКРАЩЕНИЙ

АМФ - аденозинмонофосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

АФС – аденозин-5'-фосфосульфат

БПФ – быстрое преобразование

Фурье

БСА – бычий сывороточный

альбумин

ГБ – гипотетический белок

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ДАФИ – 4,6-диамидино-2-

фенилиндол

ДНК – дезоксирибонуклеиновая

кислота

ЖК – жирная кислота

МТБ – магнитотактические

бактерии

МГО – магнетосомный геномный

остров

ОВП – окислительно-

восстановительный переход

ОТЕ – операционная

таксономическая единица

Поли-Р – полифосфат

ПЦР – полимеразная цепная

реакция

ПЭМ – просвечивающая

электронная микроскопия

ПЭМ ВР – просвечивающая

электронная микроскопия высокого

разрешения

РНК – рибонуклеиновая кислота

т.п.о. – тысяча пар оснований

п.о. – пара оснований

ФАФС – 3'-фосфоаденозин-5'-

фосфосульфат

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная

кислота

ААИ – средняя амиеокислотная

идентичность

АНИ – средняя нуклеотидная

идентичность

СТАВ –

цетилтриметиламмонийбромид

dDDH – цифровая ДНК-ДНК

гибридизация

dNTP – дезоксинуклеозид-5'-

трифосфат

FISH – флуоресцентная

гибридизация *in situ*

РОСР – попарный процент

консервативных белков

SDS – лаурилсульфат натрия

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Булыгина Е. С. Кузнецов Б. Б., Марусина А. И., Турова Т. П., Кравченко И. К., Быкова С. А., Колганова Т. В., Гальченко В. Ф. Изучение нуклеотидных последовательностей *nifH* генов у представителей метанотрофных бактерий // Микробиология. – 2002. – Т. 71. – № 4. – С. 500–508.
2. Горленко В. М., Дзюба М. В., Пантелеева А. Н. Колганова Т. В., Кузнецов Б. Б. *Magnetospirillum aberrantis* sp. nov. - новая пресноводная бактерия с магнитными включениями // Микробиология. – 2011. – Т. 80. – № 5. – С. 679–690.
3. Дзюба М.В. Разнообразие магнитотактических бактерий пресных водоемов европейской части России. Москва: 2013. – 127 с.
4. Дзюба М.В., Колганова Т. В. Горленко В. М. Кузнецов Б. Б. Видовое разнообразие магнитотактических бактерий реки Ольховка // Микробиология. – 2013. – Т. 82. – № 3. – С. 344–350.
5. Сигалевич П.А. Состав популяции магнитотропных бактерий из различных источников // Микробиология. – 1991. – Т. 60. – № 1. – С. 184–187.
6. Сигалевич П.А., Кузнецов А.А. Распространенность магнитотропных бактерий // Известия академии наук СССР. Серия биологическая. – 1986. – Т. 5. – С. 797–800.
7. Чертов Н.В. Магнитотактические бактерии водоемов Нижней Волги. Москва: 2000. – 124 с.
8. Abreu F. Martins J. L., Silveira T. S., Keim C. N., de Barros H. G., Filho F. J., Lins U. ‘Candidatus Magnetoglobus multicellularis’, a multicellular, magnetotactic prokaryote from a hypersaline environment // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2007. – V. 57. – №. 6. – P. 1318-1322.
9. Abreu F. Cantão M. E., Nicolás M. F., Barcellos F. G., Morillo V., Almeida L. G., do Nascimento F. F., Lefèvre C. T., Bazylnski D A., Vasconcelos A. T., Lins U. Common ancestry of iron oxide-and iron-sulfide-based biomineralization in magnetotactic bacteria // The ISME journal. – 2011. – V. 5. – №. 10. – P. 1634.

10. Abreu F. Carolina A., Araujo V., Leão P., Silva K. T., Carvalho F. M., Cunha O. L., Almeida L. G., Geurink C., Farina M., Rodelli D., Jovane L., Pellizari V. H., Vasconcelos A. T., Bazylnski D. A., Lins U. Culture-independent characterization of novel psychrophilic magnetotactic cocci from Antarctic marine sediments //Environmental microbiology. – 2016. – V. 18. – №. 12. – P. 4426-4441.
11. Abreu F., Leão P., Vargas G., Cypriano J., Figueiredo V., Enrich-Prast A., Bazylnski D. A., Lins U. Culture-independent characterization of a novel magnetotactic member affiliated to the Beta class of the *Proteobacteria* phylum from an acidic lagoon //Environmental microbiology. – 2018. – V. 20. – №. 7. – P. 2615-2624.
12. Agar J. N., Yuvaniyama P., Jack R. F., Cash V. L., Smith A. D., Dean D. R., Johnson M. K. Modular organization and identification of a mononuclear iron-binding site within the NifU protein //JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry. – 2000. – V. 5. – №. 2. – P. 167-177.
13. Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J.. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs //Nucleic acids research. – 1997. – V. 25. – №. 17. – P. 3389-3402.
14. Amann R., Peplies J., Schüler D. Diversity and taxonomy of magnetotactic bacteria //Magnetoreception and magnetosomes in bacteria. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. – P. 25-36.
15. Araujo A. C., Morillo V., Cypriano J., Teixeira L. C., Leão P., Lyra S., Almeida L. G., Bazylnski D. A., Ribeiro de Vasconcelos A. T., Abreu F., Lins U. Combined genomic and structural analyses of a cultured magnetotactic bacterium reveals its niche adaptation to a dynamic environment //BMC genomics. – 2016. – V. 17. – №. 8. – P. 726.
16. Auch A. F., von Jan M., Klenk H. P., Göker M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison //Standards in genomic sciences. – 2010. – V. 2. – №. 1. – P. 117.
17. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A. A., Dvorkin M., Kulikov A. S.,

- Lesin V. M., Nikolenko S. I., Pham S., Prjibelski A. D., Pyshkin A. V., Sirotkin A. V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M. A., Pevzner P. A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing //Journal of computational biology. – 2012. – V. 19. – №. 5. – P. 455-477.
18. Bazyliniski D. A., Dean A. J., Schüler D., Phillips E. J., Lovley D. R. N₂-dependent growth and nitrogenase activity in the metal-metabolizing bacteria, *Geobacter* and *Magnetospirillum* species //Environmental microbiology. – 2000. – V. 2. – №. 3. – P. 266-273.
19. Bazyliniski D. A., Williams T. J., Lefèvre C. T., Trubitsyn D., Fang J., Beveridge T. J., Moskowitz B. M., Ward B., Schübbe S., Dubbels B. L., Simpson B. *Magnetovibrio blakemorei* gen. nov., sp. nov., a magnetotactic bacterium (*Alphaproteobacteria*: *Rhodospirillaceae*) isolated from a salt marsh //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2013a. – V. 63. – №. 5. – P. 1824-1833.
20. Bazyliniski D. A., Williams T. J., Lefèvre C. T., Berg R. J., Zhang C. L., Bowser S. S., Dean A. J., Beveridge T. J. *Magnetococcus marinus* gen. nov., sp. nov., a marine, magnetotactic bacterium that represents a novel lineage (*Magnetococcaceae* fam. nov., *Magnetococcales* ord. nov.) at the base of the *Alphaproteobacteria* //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2013b. – V. 63. – №. 3. – P. 801-808.
21. Bazyliniski D. A., Frankel R. B. Magnetosome formation in prokaryotes //Nature Reviews Microbiology. – 2004. – V. 2. – №. 3. – P. 217.
22. Bazyliniski D. A., Williams T. J. Ecophysiology of magnetotactic bacteria //Magnetoreception and magnetosomes in bacteria. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. – P. 37-75.
23. Bellini S. Su di un particolare comportamento di batteri d'acqua dolce //Istituto di Microbiologia dell'Università di Pavia. – 1963.
24. Blakemore R. Magnetotactic bacteria //Science. – 1975. – V. 190. – №. 4212. – P. 377-379.

25. Blakemore R. P., Maratea D., Wolfe R. S. Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium //Journal of bacteriology. – 1979. – V. 140. – №. 2. – P. 720-729.
26. Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data //Bioinformatics. – 2014. – V. 30. – №. 15. – P. 2114-2120.
27. Bryantseva I., Gorlenko V. M., Kompantseva E. I., Imhoff J. F., Süling J., Mityushina L. *Thiorhodospira sibirica* gen. nov., sp. nov., a new alkaliphilic purple sulfur bacterium from a Siberian soda lake //International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1999. – V. 49. – №. 2. – P. 697-703.
28. Butler R. F., Banerjee S. K. Theoretical single-domain grain size range in magnetite and titanomagnetite //Journal of Geophysical Research. – 1975. – V. 80. – №. 29. – P. 4049-4058.
29. Calugay R. J., Takeyama H., Mukoyama D., Fukuda Y., Suzuki T., Kanoh K., Matsunaga T. Catechol siderophore excretion by magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 //Journal of bioscience and bioengineering. – 2006. – V. 101. – №. 5. – P. 445-447.
30. Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis //Molecular biology and evolution. – 2000. – V. 17. – №. 4. – P. 540-552.
31. Chen Y., Zhang W. Y., Zhou K., Pan H. M., Du H. J., Xu C., Xu J. H., Pradel N., Santini C. L., Li J. H., Huang H., Pan Y. X., Xiao T., Wu L. F. Novel species and expanded distribution of ellipsoidal multicellular magnetotactic prokaryotes //Environmental microbiology reports. – 2016. – V. 8. – №. 2. – P. 218-226.
32. Cox B. L., Popa R., Bazylinski D. A., Lanoil B., Douglas S., Belz A., Engler D. L., Nealson K.H. Organization and elemental analysis of P-, S-, and Fe-rich inclusions in a population of freshwater magnetococci //Geomicrobiology Journal. – 2002. – V. 19. – №. 4. – P. 387-406.
33. Dahl C., Franz B., Hensen D., Kesselheim A., Zigann R. Sulfite oxidation in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: identification of SoeABC as a

- major player and relevance of SoxYZ in the process //Microbiology. – 2013. – V. 159. – №. 12. – P. 2626-2638.
34. Daims H., Brühl A., Amann R., Schleifer K. H., Wagner M. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set //Systematic and applied microbiology. – 1999. – V. 22. – №. 3. – P. 434-444.
35. DeLong E. F., Frankel R. B., Bazylnski D. A. Multiple evolutionary origins of magnetotaxis in bacteria //Science. – 1993. – V. 259. – №. 5096. – P. 803-806.
36. Descamps E. C. T., Monteil C. L., Menguy N., Ginet N., Pignol D., Bazylnski D. A., Lefèvre C. T. *Desulfamplus magnetovallimortis* gen. nov., sp. nov., a magnetotactic bacterium from a brackish desert spring able to biomineralize greigite and magnetite, that represents a novel lineage in the *Desulfobacteraceae* //Systematic and applied microbiology. – 2017. – V. 40. – №. 5. – P. 280-289.
37. Devouard B., Pósfai M., Hua X., Bazylnski D. A., Frankel R. B., Buseck P. R. Magnetite from magnetotactic bacteria: size distributions and twinning //American Mineralogist. – 1998. – V. 83. – №. 11. – P. 1387-1398.
38. Ricci J. C. D., Kirschvink J. L. Magnetic domain state and coercivity predictions for biogenic greigite (Fe₃S₄): A comparison of theory with magnetosome observations //Journal of Geophysical Research: Solid Earth. – 1992. – V. 97. – №. B12. – P. 17309-17315.
39. Dobrindt U., Hochhut B., Hentschel U., Hacker J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms //Nature Reviews Microbiology. – 2004. – V. 2. – №. 5. – P. 414.
- 40 Du H., Zhang R., Zhang W., Xu C., Chen Y., Pan H., Zhou K., Wu L., Xiao T. Characterization of uncultivated magnetotactic bacteria from the sediments of Yuehu Lake, China //Acta Oceanologica Sinica. – 2017. – V. 36. – №. 2. – P. 94-104.
41. Faini M., Beck R., Wieland F. T., Briggs J. A. Vesicle coats: structure, function, and general principles of assembly //Trends in cell biology. – 2013. – V. 23. – №. 6. – P. 279-288.

42. Faivre D., Schuler D. Magnetotactic bacteria and magnetosomes //Chemical reviews. – 2008. – V. 108. – №. 11. – P. 4875-4898.
43. Fassbinder J. W. E., Stanjekt H., Vali H. Occurrence of magnetic bacteria in soil //Nature. – 1990. – V. 343. – №. 6254. – P. 161.
44. Flies C. B., Jonkers H. M., de Beer D., Bosselmann K., Böttcher M. E., Schüler D. Diversity and vertical distribution of magnetotactic bacteria along chemical gradients in freshwater microcosms //FEMS Microbiology Ecology. – 2005a. – V. 52. – №. 2. – P. 185-195.
45. Flies C. B., Peplies J., Schüler D. Combined approach for characterization of uncultivated magnetotactic bacteria from various aquatic environments //Appl. Environ. Microbiol. – 2005b. – V. 71. – №. 5. – P. 2723-2731.
46. Ford M. G. J., Mills I. G., Peter B. J., Vallis Y., Praefcke G. J., Evans P. R., McMahon H. T. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin //Nature. – 2002. – V. 419. – №. 6905. – P. 361.
47. Frankel R. B., Bazylinski D. A., Johnson M. S., Taylor B. L. Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria //Biophysical journal. – 1997. – V. 73. – №. 2. – P. 994-1000.
48. Freitas F., Keim C. N., Kachar B., Farina M., Lins U. Envelope ultrastructure of uncultured naturally occurring magnetotactic cocci //FEMS microbiology letters. – 2003. – V. 219. – №. 1. – P. 33-38.
49. Fukuda Y., Okamura Y., Takeyama H., Matsunaga T. Dynamic analysis of a genomic island in *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1 reveals how magnetosome synthesis developed //FEBS letters. – 2006. – V. 580. – №. 3. – P. 801-812.
50. Geelhoed J. S., Sorokin D. Y., Epping E., Tourova T.P., Banciu H. L., Muyzer G., Stams A. J., van Loosdrecht M. C. Microbial sulfide oxidation in the oxic–anoxic transition zone of freshwater sediment: involvement of lithoautotrophic *Magnetospirillum* strain J10 //FEMS microbiology ecology. – 2009. – V. 70. – №. 1. – P. 54-65.
51. Geelhoed J. S., Kleerebezem R., Sorokin D. Y., Stams A. J., van Loosdrecht M.

- C. Reduced inorganic sulfur oxidation supports autotrophic and mixotrophic growth of *Magnetospirillum* strain J10 and *Magnetospirillum gryphiswaldense* //Environmental microbiology. – 2010. – V. 12. – №. 4. – P. 1031-1040.
52. Ghosh W., Dam B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea //FEMS microbiology reviews. – 2009. – V. 33. – №. 6. – P. 999-1043.
53. González L. M., Ruder W. C., Mitchell A. P., Messner W. C., LeDuc P.R. Sudden motility reversal indicates sensing of magnetic field gradients in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 strain //The ISME journal. – 2015. – V. 9. – №. 6. – P. 1399-1409.
54. Gorby Y. A., Beveridge T. J., Blakemore R. P. Characterization of the bacterial magnetosome membrane //Journal of Bacteriology. – 1988. – V. 170. – №. 2. – P. 834-841.
55. Goris J., Konstantinidis K.T., Klappenbach J. A., Coenye T., Vandamme P., Tiedje J. M. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2007. – V. 57. – №. 1. – P. 81-91.
56. Grouzdev D. S., Dziuba M. V., Sukhacheva M. S., Mardanov A. V., Beletskiy A. V., Kuznetsov B. B., Skryabin K. G. Draft genome sequence of *Magnetospirillum* sp. strain SO-1, a freshwater magnetotactic bacterium isolated from the Ol'khovka River, Russia //Genome announcements. – 2014. – V. 2. – №. 2. – P. e00235-14.
57. Grouzdev D. S., Rysina M. S., Bryantseva I. A., Gorlenko V. M., Gaisin V. A. Draft genome sequences of ‘*Candidatus Chloroploca asiatica*’ and ‘*Candidatus Viridilinea mediisalina*’, candidate representatives of the *Chloroflexales* order: phylogenetic and taxonomic implications //Standards in genomic sciences. – 2018. – V. 13. – №. 1. – P. 24.
58. Grünberg K. Wawer C., Tebo B. M., Schüler D. A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria //Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – V. 67. – №. 10. – P. 4573-4582.

59. Grünberg K., Müller E. C., Otto A., Reszka R., Linder D., Kube M., Reinhardt R., Schüler D. Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense* //Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 70. – №. 2. – P. 1040-1050.
60. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies //Bioinformatics. – 2013. – V. 29. – №. 8. – P. 1072-1075.
61. Hoang D. T., Chernomor O., von Haeseler A., Minh B. Q., Vinh L. S. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation //Molecular Biology and Evolution. – 2017. – V. 35. – №. 2. – P. 518-522.
62. Hryniewicz M. M., Kredich N. M. The *cysP* promoter of *Salmonella typhimurium*: characterization of two binding sites for CysB protein, studies of in vivo transcription initiation, and demonstration of the anti-inducer effects of thiosulfate //Journal of bacteriology. – 1991. – V. 173. – №. 18. – P. 5876-5886.
63. Huber T., Faulkner G., Hugenholtz P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments //Bioinformatics. – 2004. – V. 20. – №. 14. – P. 2317-2319.
64. Hügler M., Sievert S. M. Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean //Annual review of marine science. – 2011. – V. 3. – P. 261-289.
65. Isambert A., Menguy N., Larquet E., Guyot F., Valet J.-P. Transmission electron microscopy study of magnetites in a freshwater population of magnetotactic bacteria //American Mineralogist. – 2007. – V. 92. – №. 4. – P. 621-630.
66. Ji B., Zhang S. D., Arnoux P., Rouy Z., Alberto F., Philippe N., Murat D., Zhang W. J., Rioux J. B., Ginet N., Sabaty M., Mangenot S., Pradel N., Tian J., Yang J., et al. Comparative genomic analysis provides insights into the evolution and niche adaptation of marine *Magnetospira* sp. QH-2 strain //Environmental microbiology. – 2014. – V. 16. – №. 2. – P. 525-544.
67. Ji B., Zhang S. D., Zhang W. J., Rouy Z., Alberto F., Santini C.L., Mangenot S., Gagnet S., Philippe N., Pradel N., Zhang L., Tempel S., Li Y., Médigue C., Henrissat B., et al. The chimeric nature of the genomes of marine magnetotactic coccoid-ovoid

- bacteria defines a novel group of *Proteobacteria* //Environmental microbiology. – 2017. – V. 19. – №. 3. – P. 1103-1119.
68. Jimenez-Vicente E., Yang Z. Y., Martin Del Campo J. S., Cash V. L., Seefeldt L. C., Dean D. R. The NifZ accessory protein has an equivalent function in maturation of both nitrogenase MoFe protein P-clusters //Journal of Biological Chemistry. – 2019. – V. 294. – №. 16. – P. 6204-6213.
69. Jogler C., Lin W., Meyerdierks A., Kube M, Katzmann E., Flies C., Pan Y., Amann R., Reinhardt R., Schüler D. Toward cloning of the magnetotactic metagenome: identification of magnetosome island gene clusters in uncultivated magnetotactic bacteria from different aquatic sediments //Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – V. 75. – №. 12. – P. 3972-3979.
70. Jogler C., Kube M., Schübbe S., Ullrich S., Teeling H., Bazylynski D. A., Reinhardt R., Schüler D. Comparative analysis of magnetosome gene clusters in magnetotactic bacteria provides further evidence for horizontal gene transfer //Environmental microbiology. – 2009. – V. 11. – №. 5. – P. 1267-1277.
71. Jogler C., Wanner G., Kolinko S., Niebler M., Amann R., Petersen N., Kube M., Reinhardt R., Schüler D. Conservation of proteobacterial magnetosome genes and structures in an uncultivated member of the deep-branching *Nitrospira* phylum //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – V. 108. – №. 3. – P. 1134-1139.
72. Juhas M., van der Meer J. R., Gaillard M., Harding R. M., Hood D. W., Crook D. W. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution //FEMS microbiology reviews. – 2009. – V. 33. – №. 2. – P. 376-393.
73. Kalyaanamoorthy S., Minh B. Q., Wong T. K. F., von Haeseler A., Jermini L.S. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates // Nat. Methods. – 2017. – V. 14. – №. 6. – P. 587–589.
74. Kanehisa M., Sato Y., Kawashima M., Furumichi M., Tanabe M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation //Nucleic acids research. – 2015. – V. 44. – №. D1. – P. D457-D462.

75. Katoh K., Standley D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability //Molecular biology and evolution. – 2013. – V. 30. – №. 4. – P. 772-780.
76. Katzmann E., Scheffel A., Gruska M., Plitzko J. M., Schüler D. Loss of the actin-like protein MamK has pleiotropic effects on magnetosome formation and chain assembly in *Magnetospirillum gryphiswaldense* //Molecular microbiology. – 2010. – V. 77. – №. 1. –P. 208-224.
77. Keim C. N., Solórzano G., Farina M., Lins U. Intracellular inclusions of uncultured magnetotactic bacteria //International Microbiology. – 2005. – V. 8. – №. 2. – P. 111-117.
78. Klumpp S., Faivre D. Interplay of magnetic interactions and active movements in the formation of magnetosome chains //PLoS One. – 2012. – V. 7. – №. 3. – P. e33562.
79. Koch T., Dahl C. A novel bacterial sulfur oxidation pathway provides a new link between the cycles of organic and inorganic sulfur compounds //The ISME journal. – 2018. – V. 12. – №. 10. – P. 2479.
80. Kolinko I., Jogler C., Katzmann E., Schüler D. Frequent mutations within the genomic magnetosome island of *Magnetospirillum gryphiswaldense* are mediated by RecA //Journal of bacteriology. – 2011. – V. 193. – №. 19. – P. 5328-5334.
81. Kolinko I., Lohße A., Borg S., Raschdorf O., Jogler C., Tu Q., Pósfai M., Tompa E., Plitzko J. M., Brachmann A., Wanner G. Müller R., Zhang Y., Schüler D. Biosynthesis of magnetic nanostructures in a foreign organism by transfer of bacterial magnetosome gene clusters //Nature nanotechnology. – 2014. – V. 9. – №. 3. – P. 193.
82. Kolinko S., Jogler C., Katzmann E., Wanner G., Peplies J., Schüler D. Single-cell analysis reveals a novel uncultivated magnetotactic bacterium within the candidate division OP3 //Environmental microbiology. – 2012. – V. 14. – №. 7. – P. 1709-1721.
83. Kolinko S., Wanner G., Katzmann E., Kiemer F., Fuchs B. M., Schüler D. Clone

- libraries and single cell genome amplification reveal extended diversity of uncultivated magnetotactic bacteria from marine and freshwater environments //Environmental microbiology. – 2013. – V. 15. – №. 5. – P. 1290-1301.
84. Komeili A., Li Z., Newman D. K., Jensen G. J. Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK //Science. – 2006. – V. 311. – №. 5758. – P. 242-245.
85. Konstantinidis K. T., Rosselló-Móra R., Amann R. Uncultivated microbes in need of their own taxonomy //The ISME journal. – 2017. – V. 11. – №. 11. – P. 2399.
86. Konstantinidis K. T., Tiedje J. M. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes //Journal of bacteriology. – 2005. – V. 187. – №. 18. – P. 6258-6264.
87. Koonin E. V., Makarova K. S., Aravind L. Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification //Annual Reviews in Microbiology. – 2001. – V. 55. – №. 1. – P. 709-742.
88. Laczny C. C., Kiefer C., Galata V., Fehlmann T., Backes C., Keller A. BusyBee Web: metagenomic data analysis by bootstrapped supervised binning and annotation //Nucleic acids research. – 2017. – V. 45. – №. W1. – P. W171-W179.
89. Lane D. J. 16S/23S rRNA sequencing //Nucleic acid techniques in bacterial systematics. – 1991. – P. 115-175.
90. Leão P., Chen Y. R., Abreu F., Wang M., Zhang W. J., Zhou K., Xiao T., Wu L. F., Lins U. Ultrastructure of ellipsoidal magnetotactic multicellular prokaryotes depicts their complex assemblage and cellular polarity in the context of magnetotaxis //Environmental microbiology. – 2017. – V. 19. – №. 6. – P. 2151-2163.
91. Lefèvre C. T., Bernadac A., Yu-Zhang K., Pradel N., Wu L. F. Isolation and characterization of a magnetotactic bacterial culture from the Mediterranean Sea //Environmental microbiology. – 2009. – V. 11. – №. 7. – P. 1646-1657.
92. Lefevre C. T., Abreu F., Schmidt M. L., Lins U., Frankel R. B., Hedlund B. P., Bazylinski D. A. Moderately thermophilic magnetotactic bacteria from hot springs in Nevada //Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – V. 76. – №. 11. – P. 3740-3743.
93. Lefèvre C. T., Frankel R. B., Pósfai M., Prozorov T., Bazylinski D. A. Isolation

of obligately alkaliphilic magnetotactic bacteria from extremely alkaline environments //Environmental microbiology. – 2011a. – V. 13. – №. 8. – P. 2342-2350.

94. Lefèvre C. T., Menguy N., Abreu F., Lins U., Pósfai M., Prozorov T., Pignol D., Frankel R. B., Bazylinski D. A. A cultured greigite-producing magnetotactic bacterium in a novel group of sulfate-reducing bacteria //Science. – 2011b. – V. 334. – №. 6063. – P. 1720-1723.

95. Lefèvre C. T., Frankel R. B., Abreu F., Lins U., Bazylinski D. A. Culture-independent characterization of a novel, uncultivated magnetotactic member of the *Nitrospirae* phylum //Environmental microbiology. – 2011c. – V. 13. – №. 2. – P. 538-549.

96. Lefèvre C. T., Pósfai M., Abreu F., Lins U., Frankel R. B., Bazylinski D. A. Morphological features of elongated-anisotropic magnetosome crystals in magnetotactic bacteria of the *Nitrospirae* phylum and the *Deltaproteobacteria* class //Earth and Planetary Science Letters. – 2011d. – V. 312. – №. 1-2. – P. 194-200.

97. Lefevre C. T., Vilorio N., Schmidt M. L., Pósfai M., Frankel R. B., Bazylinski D. A. Novel magnetite-producing magnetotactic bacteria belonging to the *Gammaproteobacteria* //The ISME journal. – 2012a. – V. 6. – №. 2. – P. 440.

98. Lefèvre C. T., Schmidt M. L., Vilorio N., Trubitsyn D., Schüler D., Bazylinski D. A. Insight into the evolution of magnetotaxis in *Magnetospirillum* spp., based on *mam* gene phylogeny //Appl. Environ. Microbiol. – 2012b. – V. 78. – №. 20. – P. 7238-7248.

99. Lefèvre C. T., Trubitsyn D., Abreu F., Kolinko S., Jogler C., de Almeida L. G., de Vasconcelos A. T., Kube M., Reinhardt R., Lins U., Pignol D., Schüler D., Bazylinski D. A., Ginet N. Comparative genomic analysis of magnetotactic bacteria from the *Deltaproteobacteria* provides new insights into magnetite and greigite magnetosome genes required for magnetotaxis //Environmental microbiology. – 2013a. – V. 15. – №. 10. – P. 2712-2735.

100. Lefèvre C. T., Trubitsyn D., Abreu F., Kolinko S., de Almeida L. G., de

- Vasconcelos A. T., Lins U., Schüler D., Ginet N., Pignol D., Bazylinski D. A. Monophyletic origin of magnetotaxis and the first magnetosomes //Environmental microbiology. – 2013b. – V. 15. – №. 8. – P. 2267-2274.
101. Lefevre C. T., Bennet M., Landau L., Vach P., Pignol D., Bazylinski D. A., Frankel R. B., Klumpp S., Faivre D. Diversity of magneto-aerotactic behaviors and oxygen sensing mechanisms in cultured magnetotactic bacteria //Biophysical journal. – 2014. – V. 107. – №. 2. – P. 527-538.
102. Lefèvre C. T., Bazylinski D. A. Ecology, diversity, and evolution of magnetotactic bacteria //Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2013. – V. 77. – №. 3. – P. 497-526.
103. Lefevre C. T., Wu L. F. Evolution of the bacterial organelle responsible for magnetotaxis //Trends in microbiology. – 2013. – V. 21. – №. 10. – P. 534-543.
104. Leimkühler S., Iobbi-Nivol C. Bacterial molybdoenzymes: old enzymes for new purposes //FEMS microbiology reviews. – 2015. – V. 40. – №. 1. – P. 1-18.
105. Li J., Menguy N., Gatel C., Boureau V., Snoeck E., Patriarche G., Leroy E., Pan Y. Crystal growth of bullet-shaped magnetite in magnetotactic bacteria of the *Nitrospirae* phylum //Journal of the Royal Society Interface. – 2015. – V. 12. – №. 103. – P. 20141288.
106. Li J., Zhang H., Menguy N., Benzerara K., Wang F., Lin X., Chen Z., Pan Y. Single-cell resolution of uncultured magnetotactic bacteria via fluorescence-coupled electron microscopy //Appl. Environ. Microbiol. – 2017. – V. 83. – №. 12. – P. e00409-17.
107. Li J., Zhang H., Liu P., Menguy N., Roberts A. P., Chen H., Wang Y., Pan Y. Phylogenetic and structural identification of a novel magnetotactic *Deltaproteobacteria* strain, WYHR-1, from a freshwater lake //Appl. Environ. Microbiol. – 2019. – V. 85. – №. 14. – P. e00731-19.
108. Li X., Tong W., Wang L., Rahman S. U., Wei G., Tao S. A novel strategy for detecting recent horizontal gene transfer and its application to *Rhizobium* strains //Frontiers in microbiology. – 2018. – V. 9. – P. 973.

109. Li Y., Katzmann E., Borg S., Schüler D. The periplasmic nitrate reductase Nap is required for anaerobic growth and involved in redox control of magnetite biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense* //Journal of bacteriology. – 2012. – V. 194. – №. 18. – P. 4847-4856.
110. Li Y., Bali S., Borg S., Katzmann E., Ferguson S. J., Schüler D. Cytochrome *cd1* nitrite reductase NirS is involved in anaerobic magnetite biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense* and requires NirN for proper *d1* heme assembly //Journal of bacteriology. – 2013. – V. 195. – №. 18. – P. 4297-4309.
111. Li Y., Raschdorf O., Silva K. T., Schüler D. The terminal oxidase *cbb3* functions in redox control of magnetite biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense* //Journal of bacteriology. – 2014a. – V. 196. – №. 14. – P. 2552-2562.
112. Li Y., Sabaty M., Borg S., Silva K. T., Pignol D., Schüler D. The oxygen sensor MgFnr controls magnetite biomineralization by regulation of denitrification in *Magnetospirillum gryphiswaldense* //BMC microbiology. – 2014b. – V. 14. – №. 1. – P. 153.
113. Li Y., Xue H., Sang S. Q., Lin C. L., Wang X. Z. Phylogenetic analysis of family *Neisseriaceae* based on genome sequences and description of *Populibacter corticis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Neisseriaceae*, isolated from symptomatic bark of *Populus*× *euramericana* canker //PloS one. – 2017. – V. 12. – №. 4. – P. e0174506.
114. Lin H. H., Liao Y. C. Accurate binning of metagenomic contigs via automated clustering sequences using information of genomic signatures and marker genes //Scientific reports. – 2016. – V. 6. – P. 24175.
115. Lin W., Tian L., Li J., Pan Y. Does capillary racetrack-based enrichment reflect the diversity of uncultivated magnetotactic cocci in environmental samples? //FEMS microbiology letters. – 2008. – V. 279. – №. 2. – P. 202-206.
116. Lin W., Li J., Schüler D., Jogler C., Pan Y.. Diversity analysis of magnetotactic bacteria in Lake Miyun, northern China, by restriction fragment length polymorphism

- //Systematic and Applied Microbiology. – 2009. – V. 32. – №. 5. – P. 342-350.
117. Lin W., Jogler C., Schöler D., Pan Y. Metagenomic analysis reveals unexpected subgenomic diversity of magnetotactic bacteria within the phylum *Nitrospirae* //Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – V. 77. – №. 1. – P. 323-326.
118. Lin W., Wang Y., Li B., Pan Y. A biogeographic distribution of magnetotactic bacteria influenced by salinity //The ISME journal. – 2012. – V. 6. – №. 2. – P. 475.
119. Lin W., Wang Y., Gorby Y., Nealson K., Pan Y. Integrating niche-based process and spatial process in biogeography of magnetotactic bacteria // Sci Rep. – 2013. – V. 3. – P. 1643.
120. Lin W., Deng A., Wang Z., Li Y., Wen T., Wu L. F., Wu M., Pan Y. Genomic insights into the uncultured genus ‘*Candidatus Magnetobacterium*’ in the phylum *Nitrospirae* //The ISME journal. – 2014a. – V. 8. – №. 12. – P. 2463-77.
121. Lin W., Bazylinski D. A., Xiao T., Wu L. F., Pan Y. Life with compass: diversity and biogeography of magnetotactic bacteria //Environmental microbiology. – 2014b. – V. 16. – №. 9. – P. 2646-2658.
122. Lin W., Paterson G. A., Zhu Q., Wang Y., Kopylova E., Li Y., Knight R., Bazylinski D. A., Zhu R., Kirschvink J. L., Pan Y. Origin of microbial biomineralization and magnetotaxis during the Archean // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2017. – V. 114. – №. 9. – P. 2171–2176.
123. Lin W., Zhang W., Zhao X., Roberts A., Paterson G. A., Bazylinski D. A., Pan Y. Genomic expansion of magnetotactic bacteria reveals an early common origin of magnetotaxis with lineage-specific evolution //The ISME journal. – 2018. – V. 12. – №. 6. – P. 1508.
124. Lin W., Li B., Pan Y. X. DMTB: a comprehensive online resource of 16S rRNA genes, ecological metadata, oligonucleotides, and magnetic properties of magnetotactic bacteria //Chinese science bulletin. – 2011. – V. 56. – №. 6. – P. 476-478.
125. Lin W., Pan Y. Uncultivated magnetotactic cocci from Yuandadu park in Beijing, China //Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – V. 75. – №. 12. – P. 4046-4052.

126. Lin W., Pan Y. Temporal variation of magnetotactic bacterial communities in two freshwater sediment microcosms //FEMS microbiology letters. – 2010. – V. 302. – №. 1. – P. 85-92.
127. Lin W., Pan Y. A putative greigite-type magnetosome gene cluster from the candidate phylum L atescibacteria //Environmental microbiology reports. – 2015. – V. 7. – №. 2. – P. 237-242.
128. Lin W., Pan Y., Bazylinski D. A. Diversity and ecology of and biomineralization by magnetotactic bacteria //Environmental microbiology reports. – 2017. – V. 9. – №. 4. – P. 345-356.
129. Lins U., Farina M. Phosphorus-rich granules in uncultured magnetotactic bacteria //FEMS microbiology letters. – 1999. – V. 172. – №. 1. – P. 23-28.
130. Loy A., Arnold R., Tischler P., Rattei T., Wagner M., Horn M. probeCheck—a central resource for evaluating oligonucleotide probe coverage and specificity //Environmental microbiology. – 2008. – V. 10. – №. 10. – P. 2894-2898.
131. Luo C., Rodriguez-r L. M., Konstantinidis K. T. MyTaxa: an advanced taxonomic classifier for genomic and metagenomic sequences //Nucleic acids research. – 2014. – V. 42. – №. 8. – P. e73.
132. Lycus P. Lovise Bøthun K., Bergaust L., Peele Shapleigh J., Reier Bakken L., Frostegård Å. Phenotypic and genotypic richness of denitrifiers revealed by a novel isolation strategy //The ISME journal. – 2017. – V. 11. – №. 10. – P. 2219.
133. Marchler-Bauer A., Bo Y., Han L., He J., Lanczycki C. J., Lu S., Chitsaz F., Derbyshire M. K., Geer R. C., Gonzales N. R., Gwadz M., Hurwitz D. I., Lu F., Marchler G. H., Song J., et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures //Nucleic acids research. – 2016. – V. 45. – №. D1. – P. D200-D203.
134. Martínez-Mera I., Espinosa-Pesqueira M. E., Pérez-Hernández R. Arenas-Alatorre J. Synthesis of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles without surfactants at room temperature //Materials Letters. – 2007. – V. 61. – №. 23-24. – P. 4447-4451.
135. Martins J. L., Silveira T. S., Abreu F., de Almeida F. P., Rosado A. S., Lins U.

- Spatiotemporal distribution of the magnetotactic multicellular prokaryote *Candidatus Magnetoglobus multicellularis* in a Brazilian hypersaline lagoon and in microcosms //Int. Microbiol. – 2012. – V. 15. – №. 3. – P. 141-149.
136. Mathuriya A. S. Magnetotactic bacteria: nanodrivers of the future //Critical reviews in biotechnology. – 2016. – V. 36. – №. 5. – P. 788-802.
137. Matsunaga T., Okamura Y., Fukuda Y., Wahyudi A. T., Murase Y., Takeyama H. Complete genome sequence of the facultative anaerobic magnetotactic bacterium *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1 //DNA research. – 2005. – V. 12. – №. 3. – P. 157-166.
138. Matsunaga T., Sakaguchi T., Tadakoro F. Magnetite formation by a magnetic bacterium capable of growing aerobically //Applied Microbiology and Biotechnology. – 1991. – V. 35. – №. 5. – P. 651-655.
139. Meier-Kolthoff J. P., Auch A. F., Klenk H. P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions //BMC bioinformatics. – 2013. – V. 14. – №. 1. – P. 60.
140. Meldrum F. C., Mann S., Heywood B. R., Frankel R. B., Bazylinski D. A. Electron microscopy study of magnetosomes in a cultured coccoid magnetotactic bacterium //Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences. – 1993. – V. 251. – №. 1332. – P. 231-236.
141. Moench T. T. *Bilophococcus magnetotacticus* gen. nov. sp. nov., a motile, magnetic coccus //Antonie van Leeuwenhoek. – 1988. – V. 54. – №. 6. – P. 483-496.
142. Moench T. T., Konetzka W. A. A novel method for the isolation and study of a magnetotactic bacterium //Archives of microbiology. – 1978. – V. 119. – №. 2. – P. 203-212.
143. Monteil C. L., Monteil C. L., Perrière G., Menguy N., Ginet N., Alonso B., Waisbord N., Cruveiller S., Pignol D., Lefèvre C. T. Genomic study of a novel magnetotactic *Alphaproteobacteria* uncovers the multiple ancestry of magnetotaxis //Environmental microbiology. – 2018. – V. 20. – №. 12. – P. 4415-4430.
144. Monteil C. L., Vallenet D., Menguy N., Benzerara K., Barbe V., Fouteau S.,

- Cruaud C., Floriani M., Viollier E., Adryanczyk G., Leonhardt N., Faivre D., Pignol D., López-García P., Weld R. J., Lefevre C. T. Ectosymbiotic bacteria at the origin of magnetoreception in a marine protist //Nature microbiology. – 2019. – V. 4. – №. 7. – P. 1088-1095.
145. Morillo V., Abreu F., Araujo A. C., de Almeida L. G., Enrich-Prast A., Farina M., de Vasconcelos A. T., Bazylnski D. A., Lins U. Isolation, cultivation and genomic analysis of magnetosome biomineralization genes of a new genus of South-seeking magnetotactic cocci within the *Alphaproteobacteria* //Frontiers in microbiology. – 2014. – V. 5. – P. 72.
146. Moskowitz B. M., Bazylnski D. A., Egli R., Frankel R. B., Edwards R. J. Magnetic properties of marine magnetotactic bacteria in a seasonally stratified coastal pond (Salt Pond, MA, USA) //Geophysical Journal International. – 2008. – V. 174. – №. 1. – P. 75-92.
147. Müller A. L., Kjeldsen K. U., Rattei T., Pester M., Loy A. Phylogenetic and environmental diversity of DsrAB-type dissimilatory (bi) sulfite reductases //The ISME journal. – 2015. – V. 9. – №. 5. – P. 1152.
148. Murat D., Quinlan A., Vali H., Komeili A. Comprehensive genetic dissection of the magnetosome gene island reveals the step-wise assembly of a prokaryotic organelle //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – V. 107. – №. 12. – P. 5593-5598.
149. Nakazawa H., Arakaki A., Narita-Yamada S., Yashiro I., Jinno K., Aoki N., Tsuruyama A., Okamura Y., Tanikawa S., Fujita N., Takeyama H., Matsunaga T. Whole genome sequence of *Desulfovibrio magneticus* strain RS-1 revealed common gene clusters in magnetotactic bacteria //Genome research. – 2009. – V. 19. – №. 10. – P. 1801-1808.
150. Nguyen L. T., Schmidt H. A., von Haeseler A., Minh B. Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies //Molecular biology and evolution. – 2014. – V. 32. – №. 1. – P. 268-274.
151. Orata F. D., Meier-Kolthoff J. P., Sauvageau D., Stein L.Y. Phylogenomic

analysis of the gammaproteobacterial methanotrophs (Order *Methylococcales*) calls for the reclassification of members at the genus and species levels //Frontiers in microbiology. – 2018. – V. 9. – P. 3162.

152. Pan H., Zhu K., Song T., Yu-Zhang K., Lefèvre C., Xing S., Liu M., Zhao S., Xiao T., Wu L. F. Characterization of a homogeneous taxonomic group of marine magnetotactic cocci within a low tide zone in the China Sea //Environmental Microbiology. – 2008. – V. 10. – №. 5. – P. 1158-1164.

153. Parks D. H., Imelfort M., Skennerton C. T., Hugenholtz P., Tyson G. W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes //Genome research. – 2015. – V. 25. – №. 7. – P. 1043-1055.

154. Parks D. H., Rinke C., Chuvochina M., Chaumeil P. A., Woodcroft B. J., Evans P. N., Hugenholtz P., Tyson G. W. Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life //Nature microbiology. – 2017. – V. 2. – №. 11. – P. 1533.

155. Parks D. H., Chuvochina M., Waite D. W., Rinke C., Skarszewski A., Chaumeil P. A., Hugenholtz P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life //Nature biotechnology. – 2018. – V. 36. – №. 10. – P. 996-1004.

156. Pernthaler J., Glöckner F-O., Schönhuber W., Amann R. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes //Methods in microbiology. – 2001. – V. 30. – P. 207-226.

157. Petermann H., Bleil U. Detection of live magnetotactic bacteria in South Atlantic deep-sea sediments //Earth and Planetary Science Letters. – 1993. – V. 117. – №. 1-2. – P. 223-228.

158. Petersen N., von Döbeneck T., Vali H. Fossil bacterial magnetite in deep-sea sediments from the South Atlantic Ocean //Nature. – 1986. – V. 320. – №. 6063. – P. 611.

159. Pósfai M., Lefèvre C. T., Trubitsyn D., Bazylinski D. A., Frankel R. B. Phylogenetic significance of composition and crystal morphology of magnetosome

- minerals //Frontiers in microbiology. – 2013. – V. 4. – P. 344.
160. Qian X. X., Liu J., Menguy N., Li J., Alberto F., Teng Z., Xiao T., Zhang W., Wu L-F. Identification of novel species of marine magnetotactic bacteria affiliated with *Nitrospirae* phylum //Environmental microbiology reports. – 2019. – V. 11. – №. 3. – P. 330-337.
161. Qin Q. L., Xie B. B., Zhang X. Y., Chen X. L., Zhou B. C., Zhou J., Oren A., Zhang Y. Z.. A proposed genus boundary for the prokaryotes based on genomic insights //Journal of bacteriology. – 2014. – V. 196. – №. 12. – P. 2210-2215.
162. Quevillon E., Silventoinen V., Pillai S., Harte N., Mulder N., Apweiler R., Lopez R. InterProScan: protein domains identifier //Nucleic acids research. – 2005. – V. 33. – №. Web Server issue. – P. W116-W120.
163. Rahn-Lee L., Byrne M. E., Zhang M., Le Sage D., Glenn D. R., Milbourne T., Walsworth R. L., Vali H., Komeili A. A genetic strategy for probing the functional diversity of magnetosome formation //PLoS genetics. – 2015. – V. 11. – №. 1. – P. e1004811.
164. Rahn-Lee L., Komeili A. The magnetosome model: insights into the mechanisms of bacterial biomineralization //Frontiers in microbiology. – 2013. – V. 4. – P. 352.
165. Ramos A. R., Keller K. L., Wall J. D., Pereira I. A. The membrane QmoABC complex interacts directly with the dissimilatory adenosine 5-phosphosulfate reductase in sulfate reducing bacteria //Frontiers in microbiology. – 2012. – V. 3. – P. 137.
166. Rao N. N., Gómez-García M. R., Kornberg A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival //Annual review of biochemistry. – 2009. – V. 78. – P. 605-647.
167. Rao N. N., Torriani A. Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli* //Molecular microbiology. – 1990. – V. 4. – №. 7. – P. 1083-1090.
168. Raschdorf O., Forstner Y., Kolinko I., Uebe R., Plitzko J. M., Schüler D3. Genetic and ultrastructural analysis reveals the key players and initial steps of

- bacterial magnetosome membrane biogenesis //PLOS genetics. – 2016. – V. 12. – №. 6. – P. e1006101.
169. Richter M., Kube M., Bazylinski D. A., Lombardot T., Glöckner F. O., Reinhardt R., Schüler D. Comparative genome analysis of four magnetotactic bacteria reveals a complex set of group-specific genes implicated in magnetosome biomineralization and function //Journal of bacteriology. – 2007. – V. 189. – №. 13. – P. 4899-4910.
170. Rivas-Lamelo S., Benzerara K., Lefèvre C.T., Monteil C.L., Jézéquel D., Menguy N., Viollier E., Guyot F., Férard C., Poinso M., Skouri-Panet F., Trcera N., Miot J., Duprat E. Magnetotactic bacteria as a new model for P sequestration in the ferruginous Lake Pavin. // Geochem. Persp. Let. – 2017. – V. 5. – P. 35-41.
171. Rodriguez-R L. M., Konstantinidis K. T. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. – PeerJ Preprints, 2016. – №. e1900v1.
172. Rong C., Huang Y., Zhang W., Jiang W., Li Y., Li J. Ferrous iron transport protein B gene (*feoB1*) plays an accessory role in magnetosome formation in *Magnetospirillum gryphiswaldense* strain MSR-1 //Research in microbiology. – 2008. – V. 159. – №. 7-8. – P. 530-536.
173. Rosselló-Mora R., Amann R. The species concept for prokaryotes //FEMS microbiology reviews. – 2001. – V. 25. – №. 1. – P. 39-67.
174. Sakaguchi T., Arakaki A., Matsunaga T. *Desulfovibrio magneticus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium that produces intracellular single-domain-sized magnetite particles //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2002. – V. 52. – №. 1. – P. 215-221.
175. Sakaguchi T., Burgess J. G., Matsunaga T. Magnetite formation by a sulphate-reducing bacterium //Nature. – 1993. – V. 365. – №. 6441. – P. 47.
176. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual. 1989 New York //Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, I, II &. – V. 3. – P. 1-1647.

177. Sander J., Dahl C. Metabolism of inorganic sulfur compounds in purple bacteria //The purple phototrophic bacteria. – Springer, Dordrecht, 2009. – P. 595-622.
178. Scheffel A., Gruska M., Faivre D., Linaroudis A., Plitzko J. M., Schüler D. An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria //Nature. – 2006. – V. 440. – №. 7080. – P. 110.
179. Scheffel A., Schüler D. The acidic repetitive domain of the *Magnetospirillum gryphiswaldense* MamJ protein displays hypervariability but is not required for magnetosome chain assembly //Journal of bacteriology. – 2007. – V. 189. – №. 17. – P. 6437-6446.
180. Schleifer K. H., Schüler D., Spring S., Weizenegger M., Amann R., Ludwig W., Köhler M. The genus *Magnetospirillum* gen. nov. Description of *Magnetospirillum gryphiswaldense* sp. nov. and transfer of *Aquaspirillum magnetotacticum* to *Magnetospirillum magnetotacticum* comb. nov //Systematic and Applied Microbiology. – 1991. – V. 14. – №. 4. – P. 379-385.
181. Schübbe S., Kube M., Scheffel A., Wawer C., Heyen U., Meyerdierks A., Madkour M. H., Mayer F., Reinhardt R., Schüler D. Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of *Magnetospirillum gryphiswaldense* reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island //Journal of Bacteriology. – 2003. – V. 185. – №. 19. – P. 5779-5790.
182. Schübbe S., Williams T. J., Xie G., Kiss H. E., Brettin T. S., Martinez D., Ross C. A., Schüler D., Cox B. L., Nealson K. H., Bazylinski D. A. Complete genome sequence of the chemolithoautotrophic marine magnetotactic coccus strain MC-1 //Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – V. 75. – №. 14. – P. 4835-4852.
183. Schüler D., Baeuerlein E. Dynamics of iron uptake and Fe₃O₄ biomineralization during aerobic and microaerobic growth of *Magnetospirillum gryphiswaldense* //Journal of bacteriology. – 1998. – V. 180. – №. 1. – P. 159-162.
184. Schüler D., Spring S., Bazylinski D. A. Improved technique for the isolation of magnetotactic spirilla from a freshwater sediment and their phylogenetic characterization //Systematic and applied microbiology. – 1999. – V. 22. – №. 3. – P.

466-471.

185. Schultheiss D., Schüler D. Development of a genetic system for *Magnetospirillum gryphiswaldense* //Archives of microbiology. – 2003. – V. 179. – №. 2. – P. 89-94.

186. Schulz-Vogt H. N., Pollehne F., Jürgens K., Arz H. W., Beier S., Bahlo R., Dellwig O., Henkel J. V., Herlemann D. P. R., Krüger S., Leipe T., Schott T. Effect of large magnetotactic bacteria with polyphosphate inclusions on the phosphate profile of the suboxic zone in the Black Sea //The ISME journal. – 2019. – V. 13. – №. 5. – P. 1198.

187. Sieber C. M. K., Probst A. J., Sharrar A., Thomas B. C., Hess M., Tringe S. G., Banfield J. F. Recovery of genomes from metagenomes via a dereplication, aggregation and scoring strategy //Nature microbiology. – 2018. – V. 3. – №. 7. – P. 836.

188. Simmons S. L., Bazylinski D. A., Edwards K. J. Population dynamics of marine magnetotactic bacteria in a meromictic salt pond described with qPCR //Environmental microbiology. – 2007. – V. 9. – №. 9. – P. 2162-2174.

189. Sobrinho R. L., Lins U., Bernardes M. C. Geochemical characteristics related to the gregite-producing multicellular magnetotactic prokaryote *Candidatus Magnetoglobus multicellularis* in a hypersaline lagoon //Geomicrobiology Journal. – 2011. – V. 28. – №. 8. – P. 705-713.

190. Spring S., Amann R., Ludwig W., Schleifer K-H., Petersen N. Phylogenetic diversity and identification of nonculturable magnetotactic bacteria //Systematic and Applied Microbiology. – 1992. – V. 15. – №. 1. – P. 116-122.

191. Spring S., Amann R., Ludwig W., Schleifer K. H., van Gernerden H., Petersen N. Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a freshwater sediment //Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – V. 59. – №. 8. – P. 2397-2403.

192. Spring S., Amann R., Ludwig W., Schleifer K-H., Schüler D., Poralla K., Petersen N. Phylogenetic analysis of uncultured magnetotactic bacteria from the

- alpha-subclass of *Proteobacteria* //Systematic and applied microbiology. – 1995. – V. 17. – №. 4. – P. 501-508.
193. Spring S., Lins U., Amann R., Schleifer K. H., Ferreira L. C., Esquivel D. M., Farina M. Phylogenetic affiliation and ultrastructure of uncultured magnetic bacteria with unusually large magnetosomes //Archives of Microbiology. – 1998. – V. 169. – №. 2. – P. 136-147.
194. Stolz J. F., Chang S. B. R., Kirschvink J. L. Magnetotactic bacteria and single-domain magnetite in hemipelagic sediments //Nature. – 1986. – V. 321. – №. 6073. – P. 849.
195. Sweitzer S. M., Hinshaw J. E. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation //Cell. – V. 93. – № 6. – P. 1021–1029.
196. Syvanen M. Horizontal Gene Transfer: Evidence and Possible Consequences //Annu. Rev. Genet. – 1994. – V. 28. – № 1. – P. 237–261.
197. Szurmant H., Ordal G.W. Diversity in Chemotaxis Mechanisms among the Bacteria and Archaea //Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2004. – V. 68. – № 2. – P. 301–319.
198. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. – 2011. – V. 28. – № 10. – P. 2731–2739.
199. Tanaka M., Okamura Y., Arakaki A., Tanaka T., Takeyama H., Matsunaga T. Origin of magnetosome membrane: proteomic analysis of magnetosome membrane and comparison with cytoplasmic membrane // Proteomics. – 2006. – V. 6. – № 19. – P. 5234–5247.
200. Tanaka M., Arakaki A., Matsunaga T. Identification and functional characterization of liposome tubulation protein from magnetotactic bacteria // Mol. Microbiol. – 2010. – V. 76. – № 2. – P. 480–488.
201. Taoka A., Eguchi Y., Mise S., Oestreicher Z., Uno F., Fukumori Y. A magnetosome-associated cytochrome MamP is critical for magnetite crystal growth

- during the exponential growth phase // FEMS Microbiol. Lett. – 2014. – V. 358. – № 1. – P. 21–29.
202. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E. P., Zaslavsky L., Lomsadze A, Pruitt K. D., Borodovsky M., Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // Nucleic Acids Res. – 2016. – V. 44. – № 14. – P. 6614–6624.
203. Tennessen K., Andersen E., Clingenpeel S., Rinke C., Lundberg D. S., Han J., Dangl J. L., Ivanova N., Woyke T., Kyrpides N., Pati A. ProDeGe : a computational protocol for fully automated decontamination of genomes // ISME J. – 2016. – V. 10. – № 1. – P. 269–272.
204. Thrash J. C., Ahmadi S., Torok T., Coates J. D. *Magnetospirillum bellicus* sp. nov., a novel dissimilatory perchlorate-reducing alphaproteobacterium isolated from a bioelectrical reactor // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – V. 76. – № 14. – P. 4730–4737.
205. Toro-Nahuelpan M., Giacomelli G., Raschdorf O., Borg S., Plitzko J. M., Bramkamp M., Schüler D., Müller F. D. MamY is a membrane-bound protein that aligns magnetosomes and the motility axis of helical magnetotactic bacteria // Nat. Microbiol. 2019. – V. 4. – № 11. – P. 1978–1989.
206. Trubitsyn D., Abreu F., Ward F. B., Taylor T., Hattori M., Kondo S., Trivedi U., Staniland S., Lins U., Bazyliniski D. A. Draft genome sequence of *Magnetovibrio blakemorei* strain MV-1, a marine vibrioid magnetotactic bacterium // Genome Announc. – 2016. – V. 4. – № 6. – P. e01330-16.
207. Tyrrell T. The relative influences of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production // Nature. 1999. – V. 400 – P. 525–531.
208. Uebe R., Voigt B., Schweder T., Albrecht D., Katzmann E., Lang C., Böttger L., Matzanke B., Schüler D. Deletion of a *fur*-like gene affects iron homeostasis and magnetosome formation in *Magnetospirillum gryphiswaldense* // J. Bacteriol. – 2010. – V. 192. – № 16. – P. 4192–4204.
209. Uebe R., Junge K., Henn V., Poxleitner G., Katzmann E., Plitzko J. M.,

- Zarivach R., Kasama T., Wanner G., Pósfai M., Böttger L., Matzanke B., Schüler D. The cation diffusion facilitator proteins MamB and MamM of *Magnetospirillum gryphiswaldense* have distinct and complex functions, and are involved in magnetite biomineralization and magnetosome membrane assembly // Mol. Microbiol. – 2011. – V. 82. – № 4. – P. 818–835.
210. Uebe R., Schüler D. Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria // Nat. Rev. Microbiol. – 2016. – V. 14. – № 10. – P. 621–637.
211. Ullrich S., Kube M., Schübbe S., Reinhardt R., Schüler D. A hypervariable 130-kilobase genomic region of *Magnetospirillum gryphiswaldense* comprises a magnetosome island which undergoes frequent rearrangements during stationary growth // J. Bacteriol. – 2005. – V. 187. – № 21. – P. 7176–7184.
212. Wagner T., Koch J., Ermler U., Shima S. Methanogenic heterodisulfide reductase (HdrABC-MvhAGD) uses two noncubane [4Fe-4S] clusters for reduction // Science. – 2017. – V. 357. – № 6352. – P. 699–703.
213. Wang Q., Wang M., Wang X., Guan G., Li Y., Peng Y., Li J. Iron response regulator protein IrrB in *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 helps control the iron/oxygen balance, oxidative stress tolerance, and magnetosome formation // Appl. Environ. Microbiol. – 2015a. – V. 81. – № 23. – P. 8044–8053.
214. Wang Y., Lin W., Li J., Zhang T., Li Y., Tian J., Gu L., Heyden Y. V., Pan Y. Characterizing and optimizing magnetosome production of *Magnetospirillum* sp. XM-1 isolated from Xi'an City Moat, China // FEMS Microbiol. Lett. – 2015b. – V. 362. – № 21. – P. 1–26.
215. Wenter R., Wanner G., Schüler D., Overmann J. Ultrastructure, tactic behaviour and potential for sulfate reduction of a novel multicellular magnetotactic prokaryote from North Sea sediments // Environ. Microbiol. – 2009. – V. 11. – № 6. – P. 1493–1505.
216. Williams T. J., Zhang C. L., Scott J. H., Bazylinski D. A. Evidence for autotrophy via the reverse tricarboxylic acid cycle in the marine magnetotactic coccus strain MC-1 // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – V. 72. – № 2. – P. 1322–1329.

217. Williams T.J., Lefèvre C. T., Zhao W., Beveridge T. J., Bazylinski D. A. *Magnetospira thiophila* gen. nov., sp. nov., a marine magnetotactic bacterium that represents a novel lineage within the *Rhodospirillaceae* (*Alphaproteobacteria*) // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2012. – V. 62. – № 10. – P. 2443–2450.
218. Wilson K. Preparation of Genomic DNA from Bacteria // Curr Protoc Mol Biol. 2001. V. 56. № 1. P. 2.4.1-2.4.5.
219. Woehl T.J., Kashyap S., Firlar E., Perez-Gonzalez T., Faivre D., Trubitsyn D., Bazylinski D. A., Prozorov T. Correlative electron and fluorescence microscopy of magnetotactic bacteria in liquid: toward in vivo imaging // Sci. Rep. – 2014. – V. 4. – P. 6854.
220. Wolfe R.S., Thauer R.K., Pfennig N. A 'capillary racetrack' method for isolation of magnetotactic bacteria // FEMS Microbiol. Lett. – 1987. – V. 45. – P. 31–35.
221. Wright E.S., Yilmaz L. S., Corcoran A. M., Ökten H. E., Noguera D. R. Automated design of probes for rRNA-targeted fluorescence in situ hybridization reveals the advantages of using dual probes for accurate identification // Appl. Environ. Microbiol. – 2014. – V. 80. – № 16. – P. 5124–5133.
222. Wu Y. W., Tang Y. H., Tringe S. G., Simmons B. A., Singer S. W. MaxBin: an automated binning method to recover individual genomes from metagenomes using an expectation-maximization algorithm // Microbiome. – 2014. – V. 2. – P. 26.
223. Xu C., Zhang W., Pan H., Du H., Xiao T. Distribution and diversity of magnetotactic bacteria in sediments of the Yellow Sea continental shelf // J. Soils Sediments. – 2018. – V. 18. – № 7. – P. 2634–2646.
224. Yanli L., Gao M., Dai S., Peng K., Jia R. Characterization of magnetotactic bacteria and their magnetosomes isolated from Tieshan iron ore in Hubei Province of China // Mater. Sci. Eng. C. – 2006. – V. 26. – № 4. – P. 597–601.
225. Zhang H., Menguy N., Wang F., Benzerara K., Leroy E., Liu P., Liu W., Wang C., Pan Y., Chen Z., Li J. Magnetotactic coccus strain SHHC-1 affiliated to *Alphaproteobacteria* forms octahedral magnetite magnetosomes // Front. Microbiol. – 2017. – V. 8. – P. 969.

226. Zhang W. Y., Zhou K., Pan H. M., Yue H. D., Jiang M., Xiao T., Wu L. F. Two genera of magnetococci with bean-like morphology from intertidal sediments of the Yellow Sea, China // *Appl. Environ. – Microbiol.* – 2012. – V. 78. – № 16. – P. 5606–5611.
227. Zhou K., Zhang W. Y., Yu-Zhang K., Pan H. M., Zhang S. D., Zhang W. J., Yue H. D., Li Y., Xiao T., Wu L. F. A novel genus of multicellular magnetotactic prokaryotes from the Yellow Sea // *Environ. Microbiol.* – 2012. – V. 14. – № 2. – P. 405–413.
228. Zhu K., Pan H., Li J., Yu-Zhang K., Zhang S. D., Zhang W. Y., Zhou K., Yue H., Pan Y., Xiao T., Wu L-F. Isolation and characterization of a marine magnetotactic spirillum axenic culture QH-2 from an intertidal zone of the China Sea // *Res. Microbiol.* – 2010. – V. 161. – № 4. – P. 276–283.
229. Zhuang L., Zhang W., Zhao Y., Shen H., Lin H., Liang J. Preparation and characterization of Fe₃O₄ particles with novel nanosheets morphology and magnetochromatic property by a modified solvothermal method // *Sci. Rep.* – 2015. – V. 5. – P. 9320.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица A1 - Белки, кодируемые генами региона МГО, штамма UR-1 и ближайшие к ним белки из GenBank. Поиск был выполнен с помощью BLASTP

Белок	Номер в GenBank	Бактерия с наивысшим уровнем сходства	Покрывтие, %	E value	Сходство, %	Номер в GenBank
ГБ	WP_130470090	<i>Desulfonema ishimotonii</i>	56	5,00E-63	43	GBC61038
ГБ	WP_130470091	<i>Magnetospirillum moscoviense</i> BB-1	96	3,00E-117	57	WP_068504061
ГБ	WP_130470092	<i>Aeromonas bestiarum</i>	88	3,00E-31	47	WP_103471428
ГБ	WP_130470093	<i>Sedimentisphaera salicampi</i>	83	1,00E-28	40	OXU14850
ГБ	WP_130470094	<i>Magnetospira</i> sp. QH-2	86	1,00E-36	32	WP_046021963
ГБ	WP_130470095	'Ca. Magnetococcus massalia' MO-1	42	1,00E-34	49	CRH05896
ГБ	WP_130470096	<i>Desulfobulbus</i> sp.	33	0.001	25	RJX23932
ГБ	WP_130470097	<i>Pseudomonas weihenstephanensis</i>	32	2,00E-07	35	WP_048366243
ГБ	WP_130470098	'Ca. Magnetococcus massalia' MO-1	94	3,00E-38	54	CRH05896
ГБ	WP_130470099	<i>Zavarzinella formosa</i>	63	1,00E-117	39	WP_020475639
ГБ	WP_130470100	'Magnetofaba australis' IT-1	75	3,00E-33	41	WP_085440034
ГБ	WP_130470101	<i>Pseudoalteromonas neustonica</i>	23	0.16	33	WP_064436108
MamT	WP_130470102	'Ca. Magnetococcus massalia' MO-1	91	1,00E-38	47	CRH04732
MamS	WP_130470103	'Magnetofaba australis' IT-1	55	6,00E-36	52	WP_085440037
MamB	WP_130470104	<i>Magnetococcus marinus</i> MC-1	98	4,00E-117	56	WP_011713872
MamQ	WP_130470105	'Ca. Magnetococcus massalia' MO-1	56	1,00E-71	45	CRH04728
MamA	WP_130470106	'Magnetofaba australis' IT-1	94	4,00E-60	47	WP_085440041
MamP	WP_130470107	'Ca. Magnetococcus massalia' MO-1	100	1,00E-86	49	CRH04725
MamO	WP_130470108	<i>Magnetococcus marinus</i> MC-1	99	2,00E-165	43	WP_011713877
MamN	WP_130470109	uncultured bacterium	99	4,00E-118	46	CAX83794
MamM	WP_130470110	'Ca. Magnetococcus massalia' MO-1	97	2,00E-122	55	CRH04723
MamL	WP_130470111	'Ca. Magnetococcus massalia' MO-1	100	9,00E-17	47	CRH04722
MamF-like	WP_130470112	'Ca. Magnetococcus massalia' MO-1	90	4,00E-38	58	CRH04721
MamK	WP_130470113	'Magnetofaba australis' IT-1	95	2,00E-145	58	WP_085440046
ГБ	WP_130470114	-	-	-	-	-
MamE	WP_130470115	'Ca. Magnetococcus massalia' MO-1	98	9,00E-122	36	CRH04718
MamI	WP_130470116	'Magnetofaba australis' IT-1	100	1,00E-21	55	WP_085440049
MamH	WP_130470117	'Magnetofaba australis' IT-1	93	7,00E-170	60	WP_085440050

Таблица A1. Продолжение

Белок	Номер в GenBank	Бактерия с наивысшим уровнем сходства	Покрытие, %	E value	Сходство, %	Номер в GenBank
MmsF	WP_130470118	<i>Ca. Terasakiella magnetica</i>	89	3,00E-33	55	WP_069186785
MamD-like	WP_130470119	<i>Magnetospirillum caucaseum</i> SO-1	34	1,00E-18	50	WP_008621324
ГБ	WP_130470120	<i>Salinisphaera</i> sp. LB1	72	8,00E-28	32	WP_109992021
ГБ	WP_130470121	<i>Desulfovibrio legallii</i>	86	6,00E-51	39	WP_092155400
ГБ	WP_130470122	<i>Thioflavicoccus mobilis</i>	25	2,00E-31	30	WP_015280688
Транспортер железа (II) FeoA	WP_130470123	Nitrospira bacterium SG8_35_4	80	4,00E-58	48	KPK02488
MamB	WP_130471889	<i>Magnetospirillum caucaseum</i> SO-1	92	5,00E-59	38	WP_040477222
Транспортер железа (II) FeoB	WP_130471890	Nitrospira bacterium SG8_35_4	95	4,00E-100	42	KPK02482
MamK	WP_130472155	' <i>Magnetofaba australis</i> ' IT-1	98	3,00E-139	54	WP_085440046

Таблица A2 - Белки, кодируемые генами региона МГО, штамма UR-1 1 и ближайшие к ним белки из GenBank. Поиск был выполнен с помощью TBLASTN

Белок	Номер в GenBank	Бактерия с наивысшим уровнем сходства	Покрытие, %	E value	Сходство, %	Номер в GenBank
ГБ	WP_130470090	WMHbinv6	99	0.0	98	PDZV01000001
ГБ	WP_130470091	WMHbinv6	100	0,00E+00	100	PDZV01000001
ГБ	WP_130470092	WMHbinv6	100	3,00E-90	99	PDZV01000001
ГБ	WP_130470093	WMHbinv6	100	4,00E-122	100	PDZV01000001
ГБ	WP_130470094	WMHbinv6	100	0,00E+00	100	PDZV01000001
ГБ	WP_130470095	WMHbinv6	100	0,00E+00	100	PDZV01000001
ГБ	WP_130470096	WMHbinv6	100	0.0	100	PDZV01000001
ГБ	WP_130470097	WMHbinv6	100	0,00E+00	97	PDZV01000001
ГБ	WP_130470098	WMHbinv6	100	6,00E-87	99	PDZV01000001
ГБ	WP_130470099	WMHbinv6	100	0,00E+00	90	PDZV01000001
ГБ	WP_130470100	WMHbinv6	100	8,00E-111	91	PDZV01000001
ГБ	WP_130470101	WMHbinv6	100	2,00E-176	95	PDZV01000001
MamT	WP_130470102	WMHbinv6	100	5,00E-92	95	PDZV01000001
MamS	WP_130470103	WMHbinv6	100	2,00E-101	96	PDZV01000001
MamB	WP_130470104	WMHbinv6	100	0,00E+00	99	PDZV01000001
MamQ	WP_130470105	WMHbinv6	85	0,00E+00	94	PDZV01000001
MamA	WP_130470106	WMHbinv6	100	4,00E-152	99	PDZV01000001
MamP	WP_130470107	WMHbinv6	100	2,00E-141	88	PDZV01000001
MamO	WP_130470108	WMHbinv6	100	0,00E+00	97	PDZV01000001
MamN	WP_130470109	WMHbinv6	100	0,00E+00	99	PDZV01000001

Таблица A2. Продолжение

Белок	Номер в GenBank	Бактерия с наивысшим уровнем сходства	Покрытие, %	E value	Сходство, %	Номер в GenBank
MamM	WP_130470110	WMHbinv6	100	0,00E+00	98	PDZV01000001
MamL	WP_130470111	WMHbinv6	100	7,00E-26	99	PDZV01000001
MamF-like	WP_130470112	WMHbinv6	100	2,00E-62	97	PDZV01000001
MamK	WP_130470113	WMHbinv6	100	0.0	99	PDZV01000001
ГБ	WP_130470114	WMHbinv6	100	0.0	94	PDZV01000001
MamE	WP_130470115	WMHbinv6	100	0,00E+00	96	PDZV01000001
MamI	WP_130470116	WMHbinv6	100	1,00E-25	99	PDZV01000001
MamH	WP_130470117	WMHbinv6	100	0,00E+00	99	PDZV01000001
MmsF	WP_130470118	WMHbinv6	100	8,00E-65	99	PDZV01000001
MamD-like	WP_130470119	WMHbinv6	100	5,00E-63	99	PDZV01000001
ГБ	WP_130470120	WMHbinv6	99	0,00E+00	97	PDZV01000001
ГБ	WP_130470121	WMHbinv6	100	0,00E+00	99	PDZV01000001
ГБ	WP_130470122	WMHbinv6	100	0,00E+00	95	PDZV01000001
Транспортер железа (II) FeoA	WP_130470123	WMHbinv6	100	3,00E-146	94	PDZV01000001
MamB	WP_130471889	WMHbinv6	99	2,00E-130	88	PDZV01000001
Транспортер железа (II) FeoB	WP_130471890	WMHbinv6	100	0,00E+00	99	PDZV01000001
MamK	WP_130472155	YD0425bin7	100	0,00E+00	88	WMHbinv6