

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

На правах рукописи

Ельченинов Александр Геннадьевич

МЕТАБОЛИЗМ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ФИЛУМА *PLANCTOMYCETES*, ОБИТАЮЩИХ В
ТЕРМАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

1.5.11 – Микробиология

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Кубланов И.В.

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Актуальность работы.....	4
Цель и задачи исследования	5
Научная новизна и значимость работы	6
Практическая значимость.....	6
Апробация работы.....	6
Публикации.....	7
Объем и структура	8
Место проведения работы и благодарности	8
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
Глава 1. История изучения и общие характеристики планктомицетов.....	9
Глава 2. Филогенетическое разнообразие представителей <i>Planctomycetes</i>	13
Глава 3. Особенности метаболизма <i>Planctomycetes</i>	16
3.1. Общие свойства метаболизма анаэробных планктомицетов.....	16
3.2. Способность гетеротрофных планктомицетов к разложению биополимеров	17
3.3. Ферменты, разлагающие олиго- и полисахариды –CAZymes.....	24
3.3.1. Принцип действия гликозидаз.....	24
3.3.2. Принцип действия полисахаридлиаз	25
3.3.3. Принцип действия карбогидратэстераз.....	26
3.3.4. Классификация CAZymes	28
3.4. Центральный катаболизм гетеротрофных планктомицетов.....	30
Глава 4. Экологическое разнообразие <i>Planctomycetes</i>	32
Глава 5. Возможное применение планктомицетов в биотехнологии	35
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	36
Глава 6. Материалы и методы исследования.....	36
6.1. Объекты исследования	36
6.2. Методы исследования.....	36
6.2.1. Отбор проб	36
6.2.2. Приготовление сред	36
6.2.3. Оценка возможности роста в различных условиях	38
6.2.4. Получение чистых культур	38
6.2.5. Электронная микроскопия	38
6.2.6. Хемотаксономический анализ.....	39
6.2.7. Выделение ДНК/РНК	39

6.2.8. Секвенирование и сборка геномов, транскриптома	39
6.2.9. Филогенетический анализ	41
6.2.10. Геномный анализ	41
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	43
Глава 7. Выделение новых планктомицетов, обитающих в горячих источниках	43
Глава 8. Характеристика новых штаммов планктомицетов GM2012 и 2918.....	47
8.1. Описание штамма GM2012 – представителя нового рода и вида <i>Tautonia sociabilis</i>	47
8.1.1. Морфология клеток штамма GM2012	47
8.1.2. Условия роста штамма GM2012	49
8.1.3. Сравнение ключевых характеристик штамма GM2012 с другими родами семейства <i>Isosphaeraceae</i>	53
8.2. Описание штамма 2918 – представителя нового рода и вида <i>Thermogemmata fonticola</i>	55
8.2.1. Морфология клеток штамма 2918	55
8.2.2. Условия роста штамма 2918	57
8.2.3. Сравнение ключевых характеристик штамма 2918 с другими родами семейства <i>Gemmataceae</i>	62
Глава 9. <i>In silico</i> реконструкция метаболизма углеводов термофильного планктомицета <i>Thermogutta terrifontis</i> R1 с использованием геномики и транскриптомики	65
9.1. Секвенирование и общие характеристики генома <i>Thermogutta terrifontis</i> R1.....	65
9.2. Секвенирование транскриптома и его общие характеристики.....	66
9.3. Реконструкция путей деградации олиго- и полисахаридов с использованием геномики	67
9.4. Реконструкция центрального метаболизма углеводов с использованием геномики	72
9.5. Реконструкция аэробного и анаэробного дыхания с использованием геномики.....	76
9.6. Пути разложения ксантановой камеди и трегалозы, выявленные с использованием геномного и транскриптомного анализа.....	77
Глава 10. Анализ метаболизма представителей класса <i>Phycisphaerae</i> с использованием геномики.....	82
10.1. Секвенирование генома <i>Tepidisphaera mucosa</i> 2842	82
10.2. Подбор геномов <i>Phycisphaerae</i> и анализ их филогенетического положения.....	83
10.3. Анализ метаболизма представителей <i>Phycisphaerae</i> с использованием геномики	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	93
ВЫВОДЫ	94
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	95
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	96

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Планктомицеты – бактериальный филум, входящий в монофилетическую группу, называемую иногда PVC суперфилумом (*Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*) (Wagner and Horn, 2006). Первые упоминания о планктомицетах известны с начала XX-го века, однако активно изучать их стали лишь с 1980-х годов. Долгое время считалось, что они разительно отличаются от других граммотрицательных бактерий, так как в их клеточных стенках отсутствует пептидогликан (Liesack et al., 1986), они имеют изолированные мембраной компартменты внутри клеток (Lindsay et al., 2001) и обладают способностью к эндоцитозу (Lonhienne et al., 2010). Однако, в последние годы благодаря активному исследованию данной группы микроорганизмов (рис. 1), а также усовершенствованию методов исследования произошел настоящий прорыв в понимании биологии планктомицетов (Wiegand et al., 2018), в том числе и в части их особенностей, многие из которых оказались артефактами, связанными с ограничением применяемых ранее методов. Так, сейчас известно, что клеточная стенка планктомицетов содержит ультратонкий слой пептидогликана (Jeske et al., 2015), а при 3D-реконструкции клеток оказалось, что компартменты вовсе не замкнуты, а связаны между собой и образуют периплазматическое пространство сложной архитектуры (Santarella-Mellwig et al., 2013).

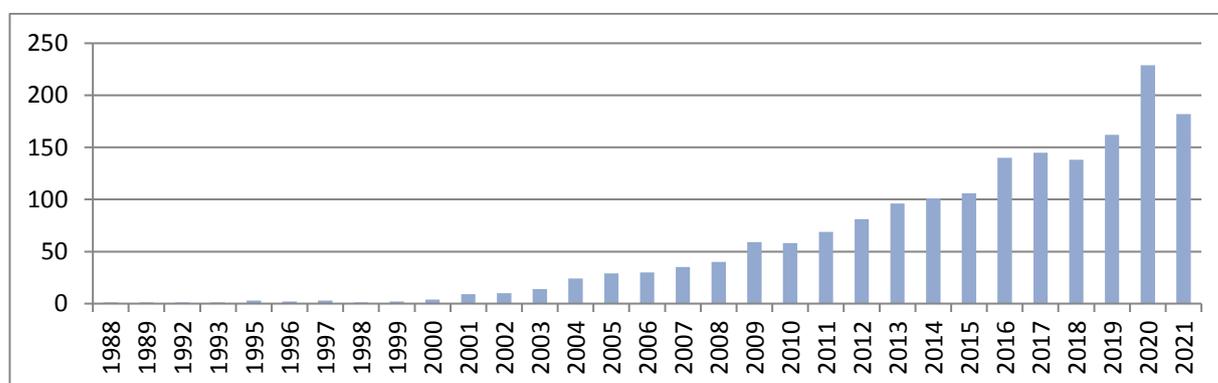


Рисунок 1. Количество публикаций по запросу «planctomycetes» согласно базе данных PubMed.

Однако, несмотря на то, что благодаря усилиям микробиологов понимание роли планктомицетов в природе стало намного глубже, все еще крайне мало известно об их истинном разнообразии и особенностях метаболизма. В первую очередь это связано с тем, что ~99% всех планктомицетов являются до сих пор некультивируемыми и лишь примерно для ~4% известны последовательности геномов (Wiegand et al., 2018).

Представители филума *Planctomycetes* обнаружены в самых разнообразных местообитаниях, таких как почва, пресные и морские водоемы (Wiegand et al., 2018), а также

в экстремальных экосистемах: пустыня Атакама в Южной Америке (Drees et al., 2006), ультрапресные кислые северные болота (Kulichevskaya et al., 2007; Kulichevskaya et al., 2009; Ivanova and Dedysh, 2012; Kulichevskaya et al., 2016).

Планктомицеты часто были детектированы и в термальных экосистемах (Hugenhlotz et al., 1998; Portillo et al., 2009; Lau et al., 2009). Однако до недавнего времени не было охарактеризовано ни одной чистой культуры термофильных планктомицетов. Первые такие организмы были выделены лишь в 2015 году: *Tepidisphaera mucosa* и *Thermogutta terrifontis* – из наземных горячих источников, *Thermogutta hypogea* – из потока термальной воды в золотодобывающей шахте (Kovaleva et al., 2015; Slobodkina et al., 2015). Наряду с аэробным метаболизмом эти микроорганизмы, в отличие от мезофильных родственников, были способны к брожению (Kovaleva et al., 2015; Slobodkina et al., 2015), а *Thermogutta* была способна и к анаэробному дыханию. Позже был описан еще один термофильный представитель *Planctomycetes* – *Thermostilla marina* (Slobokina et al., 2016), выделенный из морской гидротермы и также являющийся факультативным анаэробом. Однако, даже с учетом этих работ, можно утверждать, что сделаны только первые шаги к полному пониманию роли планктомицетов и их распространения в горячих источниках

Цель и задачи исследования

Целью работы являлось описание новых представителей филума *Planctomycetes*, обитающих в термальных экосистемах, и изучение их метаболизма, в первую очередь путей деструкции полисахаридов, центрального катаболизма углеводов и механизмов запасания энергии.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Описать новых представителей планктомицетов, обитающих в термальных экосистемах.
2. Получить и проанализировать последовательность генома термофильного планктомицета *Thermogutta terrifontis* R1 с целью реконструировать пути гидролиза используемых этой бактерией полисахаридов, пути центрального метаболизма углеводов и запасания энергии.
3. Идентифицировать гены *Thermogutta terrifontis* R1, кодирующие ферменты, участвующие в деструкции ксантановой камеди, с использованием транскриптомики.

4. Получить последовательность генома термофильного планктомицета *Tepidisphaera mucosa* 2842, проанализировать его метаболические возможности и провести сравнительный геномный анализ всех представителей класса *Phycisphaerae*.

Научная новизна и значимость работы

В ходе работы были охарактеризованы новые представители филума *Planctomycetes*, выделенные из термальных мест обитания и образующие два новых рода в семействах *Isosphaeraceae* и *Gemmataceae*.

Получена и проанализирована геномная последовательность термофильного планктомицета *Thermogutta terrifontis* R1. Был *in silico* реконструирован метаболизм *T. terrifontis* R1 – от гидролиза полисахаридов до механизмов запасания энергии. На основании транскриптомного и сравнительно-геномного анализа был предложен новый путь гидролиза ксантановой камеди.

Получена и проанализирована последовательность генома *Tepidisphaera mucosa* 2842. Проведен сравнительный анализ геномов представителей класса *Phycisphaerae*, позволивший выявить его разделение на две метаболические группы, а также провести полноценный филогеномный анализ этого класса планктомицетов.

Практическая значимость работы

Обладая множеством гидролитических ферментов, планктомицеты могут послужить источником новых гидролаз для биотехнологии; особенно перспективными в данной области могут оказаться термофильные представители (DeCastro et al., 2016). Так, ферменты, участвующие в деструкции ксантановой камеди, из *Thermogutta terrifontis*, могут снижать ее вязкость; и из них может быть сформирован ферментный препарат для нефтяной промышленности, так как ксантановая камедь широко используется в составе буровых растворов и жидкостей для гидроразрыва.

Личный вклад соискателя

Соискатель лично принимал участие в проведении экспериментов, обработке и обобщении результатов, написании статей и тезисов конференций.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на X-ой молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (27-30

октября 2015, Москва, Россия), V съезде биохимиков России (4-8 октября 2016, Сочи, Россия), 1-ом Российском Микробиологическом Конгрессе (17-18 октября 2017, Пушкино, Россия), 8th Congress of European Microbiologists FEMS2019 (7-11 July 2019, Glasgow, UK).

Публикации

Статьи:

1. **Elcheninov A.G.**, Menzel P., Gudbergsdottir S.R., Slesarev A.I., Kadnikov V.V., Krogh A., Bonch-Osvolovskaya E.A., Peng X., Kublanov I.V. Sugar metabolism of the first thermophilic planctomycete *Thermogutta terrifontis*: Comparative genomic and transcriptomic approaches // Front. Microbiol. – 2017. – V. 8. – 2140. doi: 10.3389/fmicb.2017.02140.
2. Bonch-Osmolovskaya E.A., **Elcheninov A.**, Zayulina K., Kublanov I.V. New thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities // Microbiol. Austral. – 2018. – V. 39. - № 3. – P. 122-125. doi: 10.1071/MA18038.
3. Kovaleva O.L., **Elcheninov A.G.**, Toshchakov S.V., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. *Tautonia sociabilis* gen. nov., sp. nov., a novel thermotolerant planctomycete, isolated from a 4000 m deep subterranean habitat // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2019. – V. 69. – № 8. – P. 2299-2304. doi: 10.1099/ijsem.0.003467
4. **Elcheninov A.G.**, Podosokorskaya O.A., Kovaleva O.L., Novikov A.A., Toshchakov S.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. *Thermogemmata fonticola* gen. nov., sp. nov., the first thermophilic planctomycete of the order *Gemmatales* from a Kamchatka hot spring // Syst. Appl. Microbiol. – 2021. – V. 44. – № 1. – 126157. doi: 10.1016/j.syapm.2020.126157
5. Podosokorskaya O.A., **Elcheninov A.G.**, Novikov A.A., Kublanov I.V. *Fontivita pretiosa* gen. nov., sp. nov., the thermophilic planctomycete of the order *Tepidisphaerales* from a hot spring of Baikal lake region // Syst. Appl. Microbiol. 2022. (в печати).

Тезисы конференций:

1. **Ельченинов А.Г.**, Ковалева О.Л., Тошаков С.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Кубланов И.В. Гидролитическая активность нового термофильного планктомицета *Tepidisphaera tucosa* // X молодежная школа-конференция с международным участием: «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, Россия, 27-30 октября 2015. Сборник тезисов. – С. 65-67.
2. **Ельченинов А.Г.**, Menzel P., Gudbergsdottir S.R., Krogh A., Бонч-Осмоловская Е.А., Кубланов И.В. Анализ генома термофильного планктомицета *Thermogutta terrifontis* // V съезд биохимиков России, Сочи, Россия, 4-8 октября 2016. Acta Naturae научные труды, Т. 2, С. 207

3. **Ельченинов А.Г.**, Menzel P., Gudbergsdottir S.R., Krogh A., Бонч-Осмоловская Е.А., Кубланов И.В. Реконструкция катаболизма углеводов термофильного представителя планктомицетов *Thermogutta terrifontis* с использованием геномного и транскриптомного подходов // 1-й Российский Микробиологический Конгресс, Пущино, Россия, 17-18 октября 2017. Материалы. С. 104-105.
4. **Elcheninov A.**, Toschakov S., Bonch-Osmolovskaya E., Kublanov I. Insights into metabolism of planctomycetes from *Phycisphaerae* class via comparative genomics // 8th Congress of European Microbiologists FEMS2019, Glasgow, UK, 7-11 July 2019. Abstract Book, P. 1287.

Объем и структура

Диссертация состоит из введения, 10 глав, заключения, выводов и списка литературы. Текст работы изложен на 116 страницах, содержит 37 рисунков и 16 таблиц. Список литературы содержит 206 наименований, из них 2 – на русском и 204 – на английском языке.

Место проведения работы и благодарности

Работа выполнена в лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН с 2015 по 2022 годы.

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю Илье Валерьевичу Кубланову за обучение методам геномного и филогенетического анализа, а также за помощь в планировании работы, в написании статей и тезисов конференций. Автор также благодарен всем сотрудникам Отдела биологии экстремофильных микроорганизмов, и особенно Елизавете Александровне Бонч-Осмоловской, за создание крайне благоприятной для научного творчества атмосферы.

Работа была выполнена в рамках и при поддержке проектов "Хотзаймс - систематический скрининг новых гидролаз в гидротермальных местообитаниях" ("HotZyme - Systematic screening for novel hydrolases from hot environments") и РНФ № 17-74-30025 "Энергоносители микробного происхождения: продуценты, пути образования, лабораторные модели получения". Автор выражает благодарность всем участникам этих проектов.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА 1. ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ И ОБЩИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЛАНКТОМИЦЕТОВ

Первое обнаружение планктомицетов произошло в 1924 году благодаря работам венгерского биолога Н. Гимези. Просматривая под микроскопом образец воды из озера, содержащего большое количество органического вещества, он обнаружил необычный микроорганизм, который был им идентифицирован как микроскопический гриб, видимо, в силу необычной морфологии и назван *Planctomyces bekefii*. Лишь во второй половине 20-го века, когда планктомицетов начали относительно активно изучать, они были отнесены к бактериям (Hirsch, 1972; Stackebrandt et al., 1984). В течение нескольких последующих десятилетий количество чистых культур планктомицетов возросло до нескольких десятков, что позволило сильно продвинуться в изучении их клеточной биологии, метаболизма и экологии.

До недавнего времени считалось, что представители *Planctomycetes* обладают уникальным строением клеток, отличным как от грамположительных, так и от грамотрицательных бактерий (рис. 2). Данная архитектура клеток включала: 1) наличие клеточной стенки, состоящей из белкового слоя вместо типичной пептидогликан-содержащей клеточной стенки (Liesack et al., 1986) и 2) компартментализация клеток (разделение на парифоплазму и пиреллулосому, иногда с образованием нуклеоида, окруженного мембраной) за счет внутрицитоплазматических мембран (Lindsay et al., 2001). Кроме необычной ультраструктуры клеток для планктомицетов свойственны следующие особенности: 1) эндоцитоз-подобный транспортный процесс (Lonhienne et al., 2010) за счет использования специализированных (membrane coat) белков (Santarella-Mellwig et al., 2010); 2) размножение клеток бинарным делением/почкованием без участия FtsZ, главного белка клеточного деления, гены которого отсутствуют во всех известных геномах *Planctomycetes* и 3) способность синтезировать стиролы, входящие в состав мембран (Pearson et al., 2003).

На основании таких принципиальных отличий от всех известных бактерий планктомицеты считались крайне обособленной группой. В связи с этим были предложены различные эволюционные теории с их участием, в которых клетки PVC-суперфилума рассматриваются либо как бактериальный компонент, который объединившись с археей, образовал клетку первых эукариот согласно модифицированной гипотезе «слияния» (fusion, Forterre, 2011), либо как некое промежуточное звено между бактериями и эукариотами/археями (Devos and Reynaud, 2010). Однако некоторые исследователи полагают, что общие черты между

планктомицетами и эукариотами являются примерами аналогии, а не гомологии (McInerney et al., 2011).

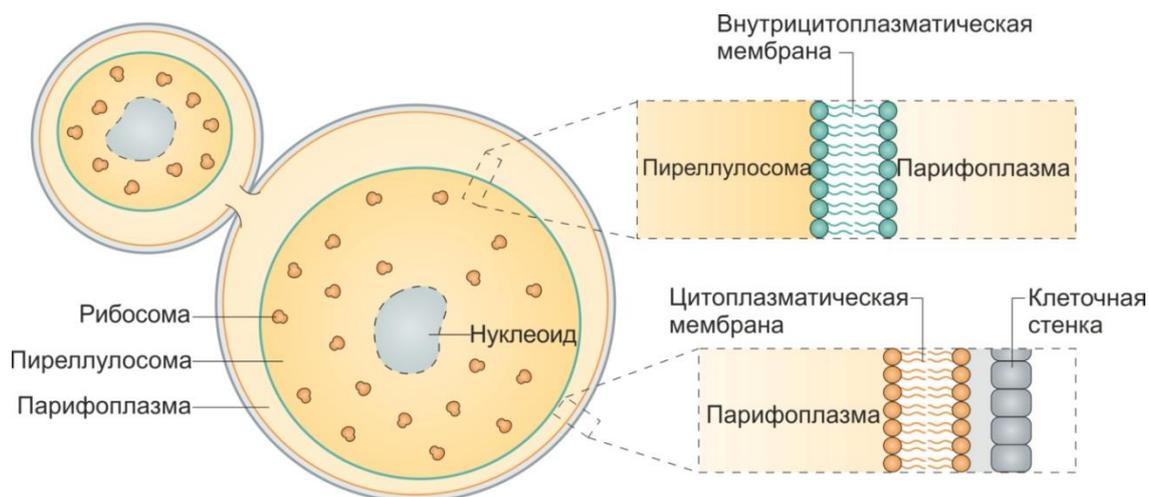


Рисунок 2. Модель клеточного строения планктомицетов, считавшаяся истинной с 1980-х до 2010-х годов (взято и изменено из Fuerst and Sagulenko, 2011).

Тем не менее, работы, посвященные изучению планктомицетов последних десяти лет, позволили кардинально изменить взгляд на выше озвученные отличия, так как полученные результаты указывают на близость *Planctomycetes* к типичным грамотрицательным бактериям. Так, в недавних работах с использованием современных методов геномики, биохимии и криоэлектронной микроскопии было показано, что планктомицеты обладают набором ключевых генов (Jeske et al., 2015), необходимых для синтеза пептидогликана (ПГ). Также напрямую было продемонстрировано образование слоя ПГ, сходного по структуре с ПГ хорошо изученных грамотрицательных бактерий (Jeske et al., 2015; van Teeseling et al., 2015). Примерно в это же время пересмотру подвергается еще одна из главных особенностей – компарментализация клеток. Трехмерная реконструкция клеток одного из модельных планктомицетов, *Gemmata obscuriglobus*, с использованием криоэлектронной томографии показала, что казавшиеся изолированными компартменты клеток, включая «ядро», соединены между собой и образуют сложную непрерывную сеть (Santarella-Mellwig et al., 2013); позже аналогичные результаты были показаны для *Planctopirus limnophila* (Boedeker et al., 2017). Полученные данные говорят о том, что на самом деле клетки планктомицетов содержат не изолированные компартменты, а крайне разветвленное и обширное периплазматическое пространство. Единственным исключением служит анаммоксосома (см. 1.3.1.), которая, действительно, имеет отдельную мембрану. Концепция процесса, сходного с эукариотическим эндоцитозом, также была несколько пересмотрена: в более поздних работах было показано, что высокомолекулярные субстраты (на примере декстрана) накапливаются в

периплазме, но не поступают в цитоплазму (Voedeker et al., 2017), то есть данный транспортный процесс является, скорее, новым типом транспорта прокариот, нежели полноценным аналогом эндоцитоза. Предположительно, такой тип транспорта помогает планктомицетам использовать различные полисахариды и, возможно, другие биополимеры в качестве ростовых субстратов, перенося высокомолекулярное соединение в периплазматическое пространство, в котором он разлагается до моно-/олигомеров, которые транспортируются затем внутрь клетки (Voedeker et al., 2017). Факт отсутствия гена белка FtsZ и некоторых других важных генов клеточного деления в геномах планктомицетов известен уже достаточно давно (Margolin, 2005), причем следует обратить внимание на то, что среди планктомицетов есть как микроорганизмы, размножающиеся почкованием (класс *Planctomycetia*), так классически делящиеся микроорганизмы (класс *Phycisphaerae*). Несмотря на то, что существуют исследования, посвященные сравнительной геномике планктомицетов, целью которых является изучение белков клеточного деления (Pilhofer et al., 2008; Jogler et al., 2012; Rivas-Marin et al., 2016), до сих пор неизвестны механизмы их деления/почкования. Особый интерес представляет поиск различий в наборах белков клеточного деления у почкующихся и делящихся планктомицетов, который позволит определить генетические детерминанты этих процессов.

Таким образом, за последние годы произошел настоящий сдвиг парадигмы в области клеточной биологии планктомицетов. Многие, казавшиеся принципиальными, отличия от граммотрицательных бактерий были пересмотрены и отклонены. И хотя представители филума *Planctomycetes* все же обладают некоторыми необычными свойствами, такими как периплазматическое пространство сложной архитектуры, размножение без участия белка FtsZ, способность к импорту полимеров в периплазматическое пространство, их сходство с другими бактериями теперь гораздо более очевидно (рис. 3).

Клетка планктомицета

Клетка типичной грамотрицательной бактерии

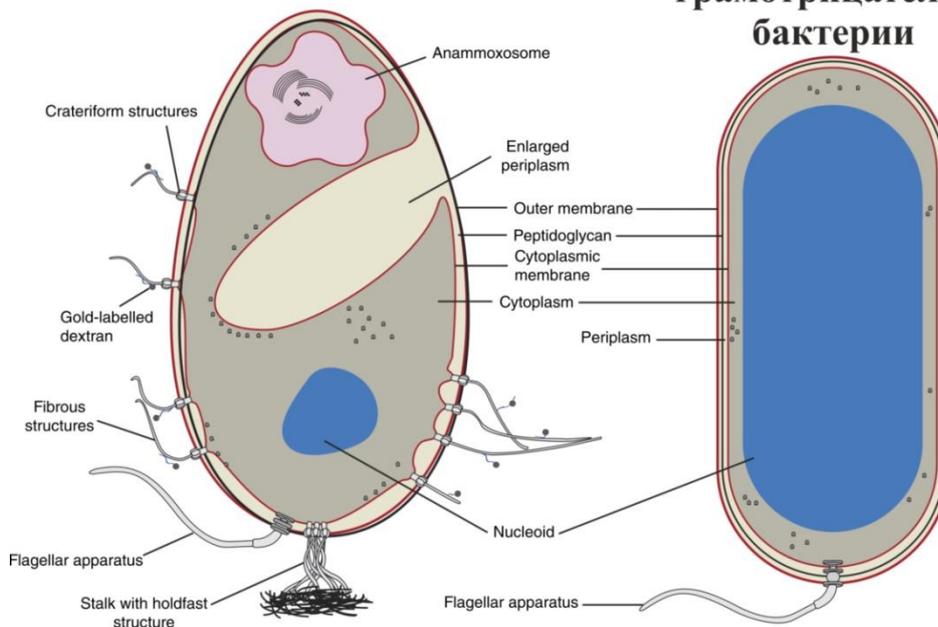


Рисунок 3. Сравнение строения клеток планктомицетов и типичных грамотрицательных бактерий с учетом последних работ (см. текст) в области клеточной биологии (взято и изменено из Voedeker et al., 2017).

ГЛАВА 2. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ *PLANCTOMYCETES*

При первом обнаружении планктомицеты были ошибочно отнесены к эукариотам (грибам) ввиду своей необычной для прокариот морфологии клеток. Намного позже они были классифицированы как прокариоты (Hirsch, 1972). Развитие методов молекулярной биологии позволило более достоверно определить принадлежность *Planctomycetes* к домену *Bacteria* (Stackebrandt et al., 1984). Позже филогенетический анализ с использованием в качестве маркеров последовательностей генов 16S рРНК (Wagner and Horn, 2006), 23S рРНК (Glockner et al., 2010) и наборов консервативных белков (Strous et al., 2006) обнаружил, что планктомицеты образуют монофилетическую группу с несколькими другими бактериальными филами – *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, *Lentisphaerae* и группой некультивируемых бактерий ОРЗ – которую часто называют PVC-суперфилумом (Wagner and Horn, 2006).

Культивируемых представителей филума *Planctomycetes* в свою очередь можно разделить на три четких филогенетических группы (рис. 4):

- 1) класс *Planctomycetia* (Ward, 2011), в который на данный момент входит большинство культивируемых планктомицетов (>100 описанных видов)
- 2) класс *Phycisphaerae* (Fukunaga et al., 2009), первый культивируемый представитель которого, *Phycisphaera mikurensis*, был описан лишь в 2009 году; на данный момент содержит 10 культивируемых представителей.
- 3) класс *Candidatus "Brocadiae"* (Wiegand et al., 2018), который представлен крайне необычными анаэробными бактериями (Kartal et al., 2013); на данный момент все еще не содержит чистых культур.

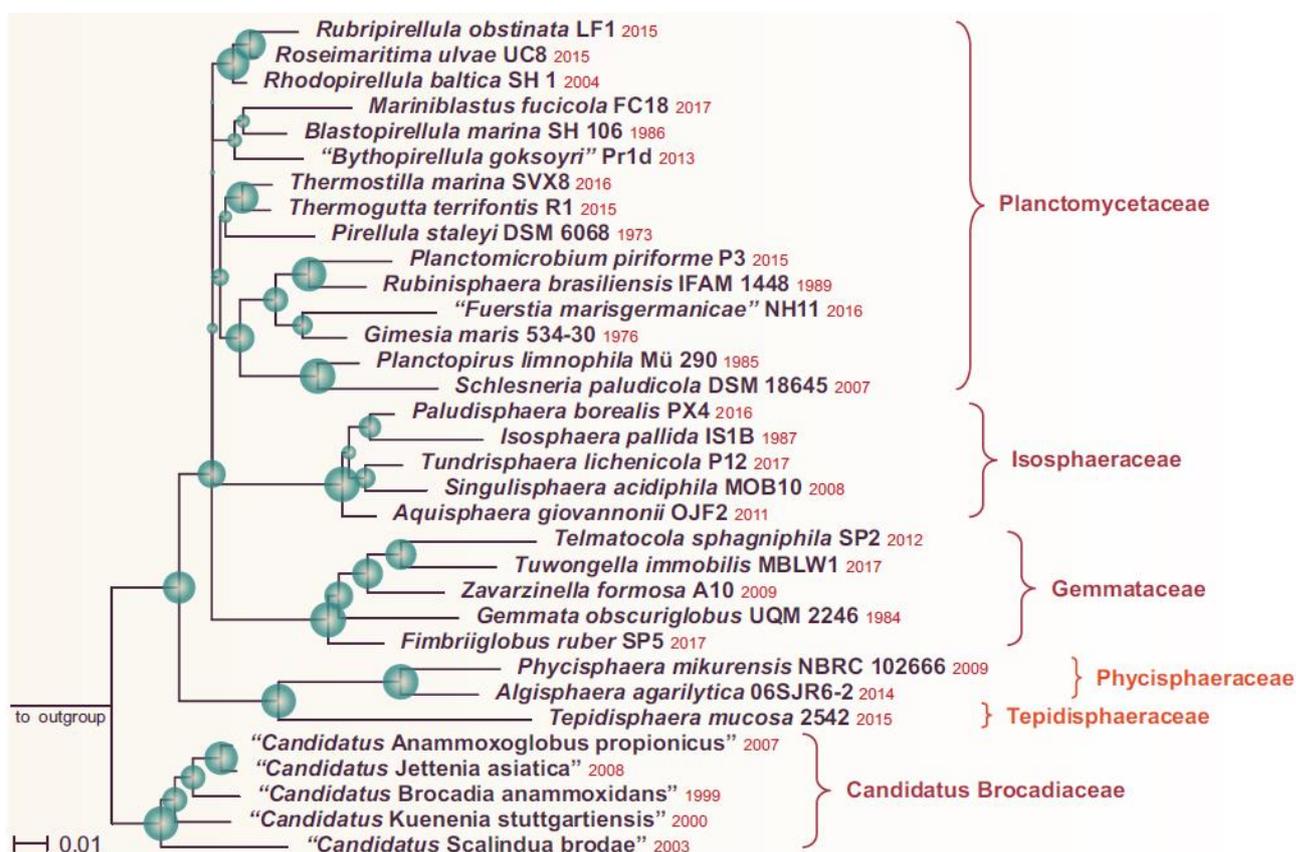


Рисунок 4. Филогенетическое дерево, основанное на сравнении последовательностей генов 16S рРНК планктомицетов (Wiegand et al., 2018).

Класс *Planctomycetia* содержит порядки *Planctomycetales*, *Isosphaeraerales* (Kulichevskaya et al. 2016; Dedysh et al., 2020) и *Gemmatales* (Kulichevskaya et al. 2017b; Dedysh et al., 2020) и *Pirellulales* (Dedysh et al., 2020). В каждом из порядков на момент написания данной работы описано 15, 6, 9 и 8 родов, соответственно. Представители *Planctomycetia* (Wiegand et al., 2018) имеют достаточно крупные (до 3 мкм) клетки сферической (*Gemmtatales* и *Isosphaerales*) или овальной формы (*Planctomycetales* и *Pirellulales*). Клетки могут быть одиночными, парными или образовывать скопления в виде розеток (большинство видов *Planctomycetales*), цепочек (*Isosphaera pallida*) или крупных бесформенных агрегатов (*Thermogutta terrifontis*, *Thermogutta hypogea*, некоторые виды из *Gemmatales*, большинство представителей *Isosphaerales*). Характерной особенностью этого класса является почкование. Стоит отметить, что представители этого класса изучены гораздо лучше других планктомицетов, так как были выделены и начали активно изучаться значительно раньше и являлись модельными организмами во многих исследованиях, посвященных клеточной биологии планктомицетов (Lindsay et al., 2001; Lonhienne et al., 2010; Santarella-Mellwig et al., 2013; Jeske et al., 2015; Boedeker et al., 2017).

В классе *Phycisphaerae* количество культивируемых представителей пока ограничивается лишь девятью родами: *Phycisphaera* (Fukunaga et al., 2009), *Algisphaera* (Yoon et al., 2014), *Tepidisphaera* (Kovaleva et al., 2015) и *Sedimentisphaera* (Spring et al., 2018), *Anaerohalosphaera* (Pradel et al., 2019), *Limihaloglobus* (Pradel et al., 2019), “*Mucisphaera*” (Kallscheuer et al., 2022), “*Humisphaera*” (Dedysh et al., 2021), *Poriferisphaera* (Kallscheuer et al., 2020h). Роды *Phycisphaera*, *Algisphaera*, *Poriferisphaera* и “*Mucisphaera*” входят в порядок *Phycisphaerales*; *Sedimentisphaera*, *Anaerohalosphaera* и *Limihaloglobus* – в порядок *Sedimentisphaerales*. А роды *Tepidisphaera* и “*Humisphaera*” образуют порядок *Tepidisphaerales*. Морфологически планктомицеты из этой группы представляют собой одиночные, парные, а иногда формирующие большие агрегаты мелкие (~1мкм) кокки. В отличие от *Planctomycetia* микроорганизмы, принадлежащие к *Phycisphaerae*, размножаются бинарным делением.

Группа *Candidatus* “*Brocadia*” (включающая анаммокс-планктомицетов) на данный момент не содержит ни одной чистой культуры, однако к ней принадлежат пять родов со статусом *Candidatus* (Kartal et al., 2013): “*Kuenenia*”, “*Brocadia*”, “*Anammoxoglobus*”, “*Jettenia*”, “*Scalindua*”. Эти бактерии имеют мелкие (< 1мкм) клетки коккоидной формы, размножаются делением (van Nirfik et al., 2009). Главной особенностью данной группы является возможность осуществлять анаэробное окисление аммония (анаммокс), уникальный процесс, встречающийся только у них. Получение энергии при окислении NH_4^+ происходит с участием комплекса ферментов и переносчиков электронов, заключенных в специализированную органеллу – анаммоксосому (см. 1.3.1.).

За последние десятилетия благодаря усилиям микробиологов количество известных видов планктомицетов и их секвенированных геномов значительно возросло до десятков (Wiegand et al., 2018; Wiegand et al., 2020) и сотен (согласно базам данных IMG, Chen et al., 2019, и GenBank), соответственно. Это позволило более полно изучить загадочный филум *Planctomycetes*, однако до сих пор мы ничего не знаем о подавляющем большинстве *Planctomycetes*: ~99% от всех планктомицетов являются до сих пор некультивируемыми и лишь примерно для ~4% известны частичные или полные последовательности геномов (Wiegand et al., 2018).

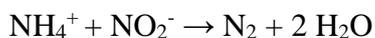
ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА *PLANCTOMYCETES*

Все планктомицеты по типу метаболизма четко делятся на две группы:

- I) Представители классов *Planctomycetia* и *Phycisphaerae* являются аэробными, факультативно анаэробными или облигатно анаэробными хемоорганогетеротрофами, преимущественно разлагающими полисахариды.
- II) Микроорганизмы из группы *Candidatus "Brocadia"* являются облигатно анаэробными автотрофами, получающими энергию за счет анаэробного окисления аммония

3.1. Общие свойства метаболизма анаммокс-планктомицетов

Поскольку анаммокс-бактерии не являются объектом данного исследования, то здесь будут описаны лишь общие представления об их метаболизме. Получение энергии у данных бактерий основано на процессе анаэробного окисления аммония, все реакции которого протекают внутри обособленного компартмента клетки – анаммоксосомы. Общее уравнение реакции анаммокс, в котором аммоний окисляется нитратом приведено ниже (van de Graaf et al., 1996):



Достаточно продолжительное время считалось, что процесс идет по следующей схеме (van de Graaf et al., 1996): 1) восстановление NO_2^- до гидросиламина (NH_2OH), 2) конденсация гидросиламина и NH_4^+ с образованием гидразина (N_2H_4) и 3) окисление гидразина с образованием молекулярного азота. Вопросы к справедливости приведенной выше схемы возникли с появлением геномных данных: гена фермента, который мог бы образовывать NH_2OH из NO_2^- (гидросиламин-оксидоредуктаза-НАО), не было обнаружено (Strous et al., 2006). Тогда на основе геномных данных и ростовых экспериментов был предложен альтернативный механизм (Strous et al., 2006, рис. 5): 1) восстановление NO_2^- до NO , 2) образование гидразина за счет соединения аммония и NO и 3) окисление гидразина с образованием N_2 .

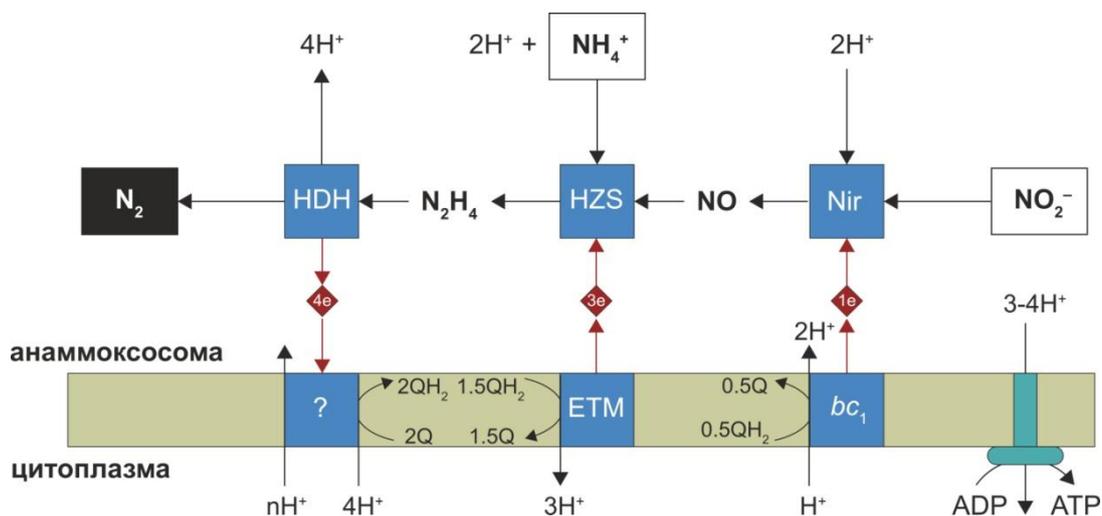


Рисунок 5. Механизм процесса анаммокс: в результате конденсации аммония и NO, образуемого из NO₂⁻ нитрат-редуктазой Nir, под действием гидразин-синтазы (HZS) синтезируется гидразин, N₂H₄. Далее гидразин расщепляется в результате работы гидразин дегидрогеназы (HDH). Электроны, необходимые для вышеописанных реакций поставляются от мембранных комплексов: bc₁ – комплекс цитохромов b и c₁ (цитохром : хинон-оксидоредуктаза); ETM – модуль переносящий электроны от восстановленных хинонов (хинолов) мембраны на HZS; “?” – неизвестный комплекс, забирающий электроны, образующиеся при окислении гидразина и восстанавливающий хиноны до хинолов; красными ромбами изображены электрон-переносящие цитохромы c (Kartal et al., 2013).

Именно за счет процесса анаммокс эти бактерии создают электрохимический протонный градиент между анаммоксосомой и цитоплазмой, который необходим для синтеза АТФ (рис. 5).

Анаммокс-бактерии являются автотрофами и фиксируют CO₂ в восстановительном пути ацетил-КоА (Strous et al., 2006). Различные органические соединения образуются у них в ходе реакций цикла трикарбоновых кислот и глюконеогенеза (Kartal et al., 2013).

3.2. Способность гетеротрофных планктомицетов к разложению биополимеров

Все известные на настоящий момент культивируемые представители классов *Planctomycetia* и *Phycisphaerae* являются гидролитиками, разлагающими олиго- и полисахариды, иногда легкоразлагаемые белковые соединения: дрожжевой экстракт, желатин (Таблица 1).

Таблица 1. Полимерные субстраты, используемые планктомицетами как источник углерода и энергии

Вид	Субстраты	Т, °С мин- макс (опт)	рН мин- макс (опт)	Ссылка
<i>Pirellula staleyi</i> ATCC 27377	раффиноза, крахмал, пектин, казеин, желатин	18-30 (24)	нд	Schlesner and Hirsch, 1984
<i>Blastopirellula marina</i> DSM 3645	раффиноза, декстрин, крахмал, хондроитин-сульфат, целлобиоза, желатин	нд-35 (27-33)	нд (7.2)	Schlesner, 1986; Schlesner et al., 2004
<i>Rhodopirellula baltica</i> DSM 10527	раффиноза, декстрин, крахмал, декстран, хондроитин-сульфат, целлобиоза, желатин	5-30 (28)	5.5-10.5 (нд)	Schlesner et al., 2004
<i>Rubinisphaera brasiliensis</i> DSM 5305	крахмал, целлобиоза, желатин	нд	нд	Schlesner, 1989; Scheuner et al., 2014
<i>Gimesia maris</i> ATCC 29201	целлобиоза, пектин	6-37.5 (30-33)	нд (7.3-7.5)	Bauld and Staley, 1976; Scheuner et al., 2014
<i>Planctopirus limnophila</i> DSM 1115	раффиноза, целлобиоза, лихенан, желатин	17-39 (30-32)	6.2-8.0 (6.2-7.0)	Hirsch and Muller, 1985; Scheuner et al., 2014
<i>Gemmata obscuriglobus</i> UQM 2246	крахмал	16-35 (нд)	нд (7.2)	Franzmann and Skerman, 1984
<i>Aquisphaera giovannonii</i> DSM 22561	крахмал, целлобиоза, желатин	10-35 (30-35)	6.5-9.5 (7.5-8.5)	Bondoso et al., 2011
<i>Schelsneria paludicola</i> VKM В-2452	хондроитин-сульфат, целлобиоза, пектин, ксилан, фукоидан, ламинарин, пуллулан, желатин	4-32 (15-26)	4.2-7.5 (5.0-6.2)	Kulichevskaya et al., 2007
<i>Singulisphaera acidiphila</i> VKM В-2454	хондроитин-сульфат, целлобиоза, пектин, ксилан, ламинарин, пуллулан, лихенан, желатин	4-33 (20-26)	4.2-7.5 (5.0-6.2)	Kulichevskaya et al., 2008

Продолжение Таблицы 1.

Вид	Субстраты	T, °C мин- макс (опт)	pH мин- макс (опт)	Ссылка
<i>Singulisphaera mucilagenosa</i> VKM В-2626	целлюлоза, ксилан	4-30 (25-28)	4.0-7.5 (6.0-6.5)	Zaichikova et al., 2011
<i>Singulisphaera rosea</i> VKM В-2599	крахмал, хондроитин-сульфат, ламинарин, пуллулан, желатин	4-33 (20-26)	3.2-7.1 (4.8-5.0)	Kulichevskaya et al., 2012a
<i>Zavarzinella formosa</i> VKM В-2478	крахмал, хондроитин-сульфат, пектин, ксилан, ламинарин, лишениан, желатин	10-30 (20-25)	3.8-7.2 (5.5-6.0)	Kulichevskaya et al., 2009
<i>Telmatocola sphagniphila</i> VKM В-2710	раффиноза, крахмал, целлюлоза*, целлобиоза, ксилан, КМЦ, ламинарин, лишениан, ксантановая камедь, желатин	6-30 (20-26)	4.0-7.0 (5.0-5.5)	Kulichevskaya et al., 2012b
<i>Rhodopirellula lusitana</i> DSM 25457	целлобиоза, КМЦ	5-35 (25)	5.0-9.5 (7.0)	Bondoso et al., 2014
<i>Rhodopirellula rubra</i> DSM 25459	раффиноза, крахмал, целлобиоза, декстран, желатин	5-30 (25)	5.0-10.0 (7.0)	Bondoso et al., 2014
<i>Roseimaritima ulvae</i> DSM 25454	крахмал, целлобиоза, декстран, КМЦ	15-35 (30)	6.5-10.0 (7.5)	Bondoso et al., 2015
<i>Rubripirellula obstinata</i> CECT 8602	крахмал	10-30 (25)	5.5-10.0 (7.5)	Bondoso et al., 2015
<i>Algisphaera agarilytica</i> KCTC 32482	крахмал, целлобиоза, желатин	20-30 (28)	6.0-8.0 (7.0)	Yoon et al., 2014
<i>Phycisphaera mikurensis</i> KCTC 22515	целлобиоза	10-30 (25-30)	нд	Fukunaga et al., 2009
<i>Thermogutta terrifontis</i> VKM В-2805	крахмал, целлобиоза, пектин, ксилан, ксантановая камедь	25-67 (55-60)	4.0-8.0 (6.0-6.5)	Slobodkina et al., 2015
<i>Thermogutta hypogea</i> VKM В-2782	крахмал, целлобиоза, пектин, ксилан, ксантановая камедь	30-60 (52)	5.0-9.0 (7.5-8.0)	Slobodkina et al., 2015

Продолжение Таблицы 1.

Вид	Субстраты	Т, °С мин- макс (опт)	pH мин- макс (опт)	Ссылка
<i>Tepeidysphaera mucosa</i> VKM В-2832	раффиноза, крахмал, декстрин, целлобиоза, пектин, ксантановая камедь	20-56 (47-50)	4.5-8.5 (7.0-7.5)	Kovaleva et al., 2015
“ <i>Bythopirellula goksoyri</i> ” Pldr	лактоза, мальтоза, сахароза, целлобиоза, крахмал	10-27 (25)	нд	Storesund and Ovreas, 2013
<i>Mariniblastus fucicola</i> FC18 ^T	раффиноза, лактоза, мальтоза, сахароза, целлобиоза, трегалоза,	10-30 (25)	6.5-8.5 (7.5)	Lage et al., 2017
<i>Blastopirellula cremea</i> JCM 17758 ^T	раффиноза, лактоза, сахароза, целлобиоза, мелибиоза, бета-циклодекстрин, маннан,	20-37 (30)	6.0-8.0 (7.0)	Lee et al., 2013
<i>Rhodopirellula rosea</i> JCM 17759 ^T	лактоза, мальтоза, сахароза, целлобиоза, трегалоза, мелибиоза	20-37 (30)	6.0-8.0 (7.0)	Roh et al., 2013
<i>Rhodopirellula caenicola</i> KCTC 32995 ^T	мальтоза, мелибиоза	20-30 (28)	6.0-8.0 (7.0)	Yoon et al., 2015
<i>Thermostilla marina</i> SVX8 ^T	мальтоза, сахароза, целлобиоза, трегалоза, крахмал, агароза, альгинат, пектин, ксантановая камедь, ксилан	32-68 (55)	5.0-9.0 (7.0-8.0)	Slobodkina et al., 2016
<i>Planctopirus hydrillae</i> KCTC 42880 ^T	сахароза, крахмал, казеин	10-45 (20-30)	6.0-9.0 (6.5-7.5)	Yadav et al., 2018
<i>Planctomicrobium piriforme</i> P3 ^T	мальтоза, сахароза, целлобиоза, трегалоза, ксилан, ламинарин, лихенан, желатин, хитин	10-30 (20-28)	4.2-7.1 (6.0-6.5)	Kulichevskaya et al., 2015; Кулическая и др., 2019
<i>Fuerstia marisgermanica</i> NH11 ^T	лактоза, мальтоза, сахароза, целлобиоза, мелибиоза, трегалоза	20-30 (28)	6.0-10.0 (7.0)	Kohn et al., 2016
<i>Tuwongella immobilis</i> DSM 105045 ^T	мальтоза	20-40 (32-36)	6.0-10.5 (7.5-8.0)	Seeger et al., 2017
<i>Fimbrioglobus ruber</i> VKM В-3045 ^T	лактоза, мальтоза, сахароза, целлобиоза, трегалоза, крахмал, ксантановая камедь, ксилан, ламинарин, лихенан, геллановая камедь, желатин	10-30 (20-25)	4.0-6.8 (5.5-6.0)	Kulichevskaya et al., 2017a

Продолжение Таблицы 1.

Вид	Субстраты	Т, °С мин- макс (опт)	рН мин- макс (опт)	Ссылка
<i>Paludisphaera borealis</i> VKM В-2904 ^T	лактоза, мальтоза, сахароза, целлобиоза, трегалоза, мелибиоза, ксилан, лихенан, геллановая камедь, пектин, желатин, раффиноза, арабинан	6-30 (15-25)	3.5-6.5 (5.0-5.5)	Kulichevskaya et al., 2016; Ivanova et al., 2017
<i>Tundrisphaera lichenicola</i> VKM В-3044 ^T	лактоза, целлобиоза, мальтоза, сахароза, мелибиоза, трегалоза, крахмал, декстрин, ксантановая камедь, ксилан, лихенан, арабиногалактан, камедь рожкового дерева, желатин	4-28 (15-22)	4.5-6.8 (5.5-6.0)	Kulichevskaya et al., 2017b
<i>Sedimentisphaera salicampi</i> DSM 101733 ^T	лактоза, мальтоза, сахароза, мелибиоза, крахмал, пуллулан, декстран	20-45 (37)	6.0-8.5 (7.5-8.0)	Spring et al., 2018
<i>Sedimentisphaera cyanobacteriorum</i> DSM 27091 ^T	лактоза, мальтоза, целлобиоза, сахароза, мелибиоза, крахмал, пуллулан, декстран	18-40 (35)	6.5-8.0 (7.5)	Spring et al., 2018
<i>Limnoglobus roseus</i> PX52	лактоза, мальтоза, целлобиоза, раффиноза, сахароза, трегалоза, арабиногалактан, декстрин, ламинарин, локуст бин гам, лихенан, пуллулан, крахмал, ксантановая камедь, желатин	10-30 (20-25)	5.0-7.5 (6.5)	Kulichevskaya et al., 2020b
<i>Lacipirellula parvula</i> PX69	лактоза, мальтоза, целлобиоза, раффиноза, сахароза, трегалоза, мелибиоза, арабиногалактан, хондроитин, декстрин, ламинарин, локуст бин гам, крахмал, ксантан, пектин, ксилан, желатин	10-30 (20-25)	5.0-7.5 (6.5)	Dedysh et al., 2020
<i>Roseimaritima sediminicola</i> JC651	лактоза, мальтоза, сахароза, крахмал	15-40 (25)	6.5-9.0 (7.5)	Kumar et al., 2020a
<i>Gimesia chilikensis</i> JC646	лактоза, сахароза, мальтоза	20-30 (25)	7.0-9.0 (8.0)	Kumar et al., 2020b

Продолжение Таблицы 1.

Вид	Субстраты	T, °C мин- макс (опт)	pH мин- макс (опт)	Ссылка
<i>Stieleria maiorica</i> Mal15	лактоза, целлобиоза, мелибиоза, трегалоза, раффиноза	11-37 (35)	5.5-9.0 (7.5)	Kallscheuer et al., 2020
<i>Gimesia benthica</i> E7	целлобиоза, трегалоза, крахмал, пектин	6-40 (30)	5.5-8.0 (7.0-7.5)	Wang et al., 2020
<i>Posidoniimonas corsicana</i> KOR34	лактоза, целлобиоза, мелибиоза, мальтоза, сахароза, декстрин, гликоген,	15-36 (33)	6.0-8.5 (7.0)	Kohn et al., 2020
<i>Thalassoglobus neptunius</i> KOR42	лактоза, целлобиоза, мелибиоза, мальтоза, сахароза	22-36 (33)	5.5-8.5 (7.0-7.5)	Kohn et al., 2020
<i>Frigoriglobus tundricola</i> PL17	лактоза, целлобиоза, мелибиоза, мальтоза, трегалоза, арабиногалактан, хондроитин, декстрин, ламинарин, лехенан, локуст бин гам, крахмал, ксантан, ксилан, желатин	4-28 (15-22)	4.2-6.8 (5.0-5.5)	Kulichevskaya et al., 2020a
<i>Paludisphaera soli</i> JC670	сахароза	10-25 (22-25)	7.0-8.0 (7.0)	Kaushik et al., 2020
<i>Roseiconus nitratreducens</i> JC645	сахароза, мальтоза, крахмал, инулин	10-35 (30)	7.0-9.0 (8.0)	Kumar et al., 2021
<i>Roseiconus lacunae</i> JC635	сахароза, мальтоза, крахмал, лактоза	10-35 (30)	6.0-9.0 (8.0)	Kumar et al., 2021
<i>Humisphaera borealis</i> M1803	лактоза, арабиногалактан, ксилан, ксантан, пектин, крахмал, ламинарин	10-30 (25)	5.5-8.0 (6.5-7.0)	Dedysh et al., 2021
<i>Bremerella alba</i> FF15	мальтоза, крахмал, хондроитин-сульфат	10-35 (30)	5.5-8.5 (6.5-7.5)	Godinho et al., 2021
<i>Tautonia marina</i> JC650	мальтоза, сахароза, крахмал	15-37 (25)	7.0-10.0 (8.0)	Guarav et al., 2021
<i>Tautonia rosea</i> JC657	мальтоза, сахароза, крахмал	10-37 (25)	7.0-10.0 (8.0)	Guarav et al., 2021

Стоит отметить, что каждый микроорганизм гипотетически может расти на гораздо большем количестве субстратов, так как для разных микроорганизмов спектр протестированных субстратов существенно различался и часто исследователи, работая даже с такой глубокой и малоисследованной группой как *Planctomycetes*, используют достаточно

стандартные наборы проверяемых субстратов. Более того, иногда, например, как в случае с *Isosphaera pallida* рост ни на полисахаридах, ни на белках просто не исследовали. Наряду с достаточно простыми соединениями (лактоза, сахароза, мальтоза и др.) некоторые организмы также используют для роста труднодоступные полимеры, такие как целлюлоза (*Telmatocola sphagniphila*), ксилан (*Schelsneria paludicola*, *Singulisphaera acidiphila*, *Zavarzinella formosa*, *Thermogutta terrifontis*, *Planctomicrobium piriforme* и др.), лихенан (*Planctopirus limnophila*, *Telmatocola sphagniphila*, *Fimbriiglobus ruber* и др.), ксантановая камедь (*Telmatocola sphagniphila*, *Thermogutta terrifontis*, *Tepidisphaera mucosa*, *Thermostilla marina*, *Tundrisphaera lichenicola*).

Кроме ростовых экспериментов по утилизации биополимеров чистыми культурами существуют другие подтверждения высокого гидролитического потенциала планктомицетов в природных сообществах. Так, например, с применением методов молекулярной экологии планктомицеты были детектированы в микробиоте кишечного тракта термитов (Kohler et al., 2008) и древесных тараканов (Berlanga et al., 2016), на поверхности водорослей (Bengtsson and Ovreas, 2010), в северных болотах (Ivanova and Dedysh, 2012; Ivanova et al., 2016), в компосте (de Gannes et al., 2013), речных осадках (Li et al., 2016a). Присутствие планктомицетов в микробных сообществах вышеуказанных экосистем это, скорее, косвенное доказательство. Однако оно соотносится и с результатами (мета)геномного секвенирования. Так, с использованием сравнительной геномики было показано наличие в геномах органотрофных планктомицетов большого числа генов ферментов, разлагающих полисахариды (carbohydrate-active enzymes – CAZymes), например, в геномах *Rhodopirella baltica* (Glockner et al., 2003), ряде других морских планктомицетов (Faria et al., 2018), метагеноме морских осадков (Quaiser et al., 2011); планктомицетах, выделенных из северных болот (Ivanova et al., 2017; Ravin et al., 2018; Rakitin et al., 2021). В дополнение к геномным данным у планктомицетов показана экспрессия генов CAZymes с использованием транскриптомики (Wegner et al., 2013) и метатранскриптомики (Li et al., 2016b; Ivanova et al., 2018). Кроме этого участие планктомицетов в разложении полимеров было продемонстрировано и напрямую с помощью метода стабильных изотопов (Schellenberger et al., 2010; Wang et al., 2015).

Учитывая все вышеизложенное, можно уверенно сказать, что планктомицеты, относящиеся к *Planctomycetia* и *Phycisphaerae*, выполняют в природе роль первичных деструкторов органического вещества, в первую очередь полисахаридов. В связи с этим для них чрезвычайно важны ферменты, осуществляющие эти процессы, общему описанию которых будет посвящена следующая глава.

3.3. Ферменты, разлагающие олиго- и полисахариды –CAZymes

В природе существует огромное количество различных моносахаридов и их сочетаний в виде олиго- и полисахаридов (Balabanova et al., 2018). Они выполняют различные биологически важные функции: структурную, энергетическую, запасную, сигнальную, протекторную и другие. За расщепление гликозидных связей в различных полисахаридах в первую очередь отвечают гликозидазы, полисахаридлиазы, углеводэстеразы и, в редких случаях, гликозилтрансферазы и оксидоредуктазы.

3.3.1. Принцип действия гликозидаз

Гликозидазы (GH; К.Ф. 3.2.1.x) – это большая группа ферментов, катализирующих расщепление O- и S-гликозидных связей.

Ферментативное расщепление гликозидных связей протекает через общий кислотный катализ, для осуществления которого необходимы два аминокислотных остатка фермента: донор протона (кислота) и нуклеофил (основание). Такой гидролиз может осуществляться с помощью двух главных механизмов (рис. 6), в результате которых аномерная конфигурация субстрата либо сохраняется путем двойного замещения (сохраняющий (retaining) механизм), либо обращается в одну стадию (обращающий (invertin) механизм) (Koshland, 1953; Sinnott, 1990).

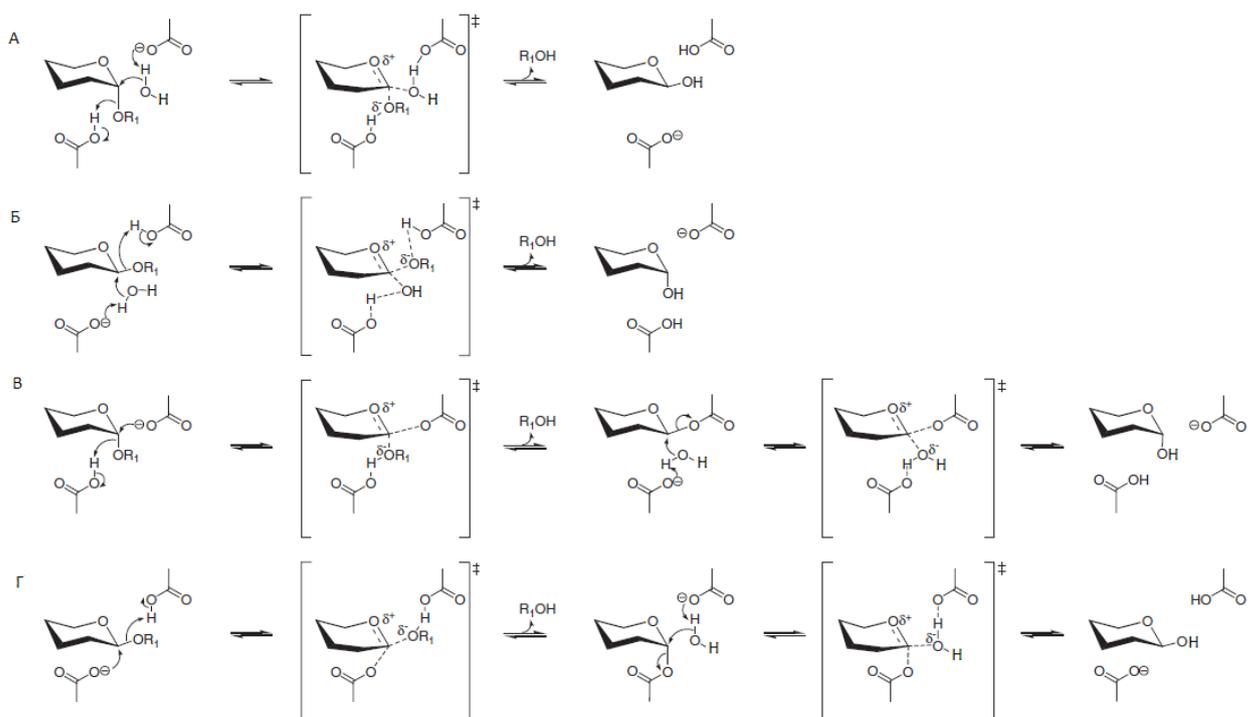


Рисунок 6. Механизм действия гликозидаз (Hancock and Withers, 2007): А – обращающая α-гликозидаза, Б – обращающая β-гликозидаза, В – сохраняющая α-гликозидаза, Г – сохраняющая β-гликозидаза.

Пространственное положение донора протона по отношению к субстрату в гликозидазах с разными механизмами идентично, а нуклеофильный остаток расположен ближе к субстрату у ферментов, работающих по сохраняющему механизму, и более отдален у ферментов с обращающим механизмом, у которых между молекулами нуклеофила и субстрата должна присутствовать молекула воды. Таким образом, среднее расстояние между двумя каталитическими остатками составляют 0.55 нм для сохраняющих гликозидаз и 1 нм – для обращающих гликозидаз (McCarter and Withers, 1994). В большинстве случаев каталитическими аминокислотными остатками являются аспартат и/или глутамат (Davies and Henrissat, 1995). Однако, в некоторых случаях могут быть использованы и другие аминокислоты; например, тирозин – в вирусной нейраминидазе и бактериальной сиалидазе.

3.3.2. Принцип действия полисахаридлиаз

Полисахаридлиазы (PL; К. Ф. 4.2.2.x) – это группа ферментов, которые расщепляют олиго- и полисахариды, содержащие уроновые кислоты, через механизм β -элиминирования с образованием ненасыщенных гексуриновых кислотных остатков и новых редуцирующих концов в точке расщепления.

Процесс β -элиминирования осуществляется в три этапа (Gacesa, 1987): 1) нейтрализация отрицательного заряда С-6 карбоксильной группы, за счет которой повышается подверженность С-5 протона к отщеплению; 2) отщепление протона от С-5 с помощью основной боковой цепи аминокислотного остатка с образованием промежуточного енолят-аниона и 3) расщепление О-4:С-4 гликозидной связи и сопутствующий перенос электрона от карбоксильной группы с формированием двойной связи между С-4 и С-5 атомами.

В зависимости от состава и конформации субстрата в активном сайте полисахаридлиаз отщепляемый от С-5 протон и отщепляемый от С-4 кислород могут находиться либо в *syn*- (по одной стороне цикла уроновой кислоты), либо в *anti*-положении (по разные стороны цикла). Это, в свою очередь, накладывает определенные требования к расположению активных групп и определяет возможность для поэтапного или синхронного осуществления реакций β -элиминирования (Lombard et al., 2010, рис. 7).

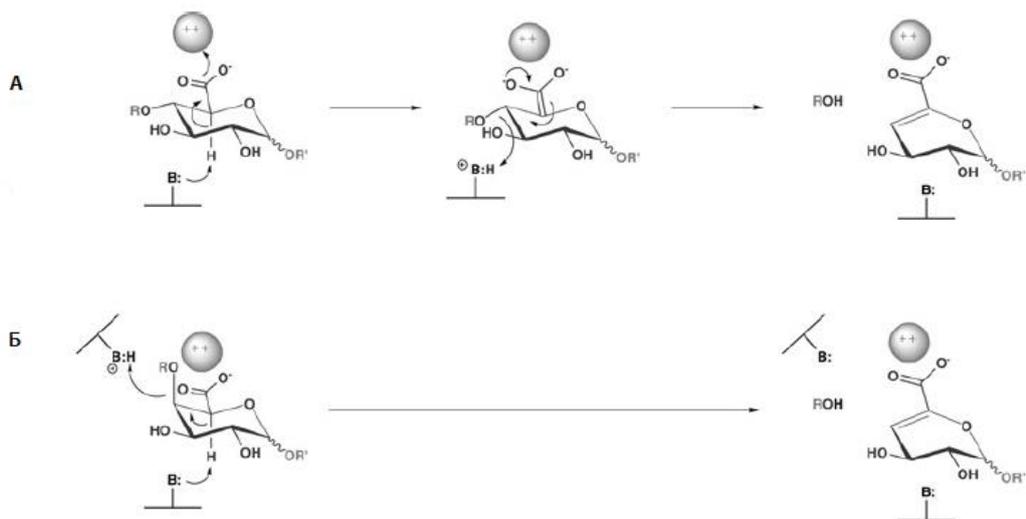


Рисунок 7. Механизм действия полисахаридлиаз (Lombard et al., 2010): А – *syn*-элиминирование (хондроитинлиаза), Б – *anti*-элиминирование (пектатлиаза).

В зависимости от природы группы, нейтрализующей отрицательный заряд карбоксильной группы, и аминокислотных остатков, выполняющих роль кислоты и основания, полисахаридлиазы разделяют на две группы (Garron and Cygler, 2010):

- I. металл (Ca^{2+} , реже Mn^{2+})-зависимая нейтрализация карбоксильной группы; лизин или аргинин в роли основания и молекула воды в роли кислоты
- II. нейтрализация карбоксильной группы с помощью аспарагина/глутамин или протонированных аспартата/глутамата; тирозин или гистидин в роли основания и тирозин в роли кислоты.

3.3.3. Принцип действия углеводэстераз

Карбогидратэстеразы – ферменты класса гидролаз подкласса эстераз (К.Ф. 3.1(5).1.х), которые катализируют гидролиз сложных эфиров, состоящих из сахаров (в роли кислоты или спирта) и других групп (ацетильных или метильных).

Для карбогидратэстераз существуют два типа субстратов:

- I. сахар выступает в роли спирта в сложном эфире (например, ацетилксиланэстеразы)
- II. сахар выступает в роли кислоты в сложном эфире (например, пектинметилэстеразы)

Для первой группы возможны два механизма катализа. Для большинства данных ферментов характерен катализ через триаду серин-гистидин-аспартат (Ser-His-Asp) по аналогии с сериновыми пептидазами и классическими липазами (рис. 8).

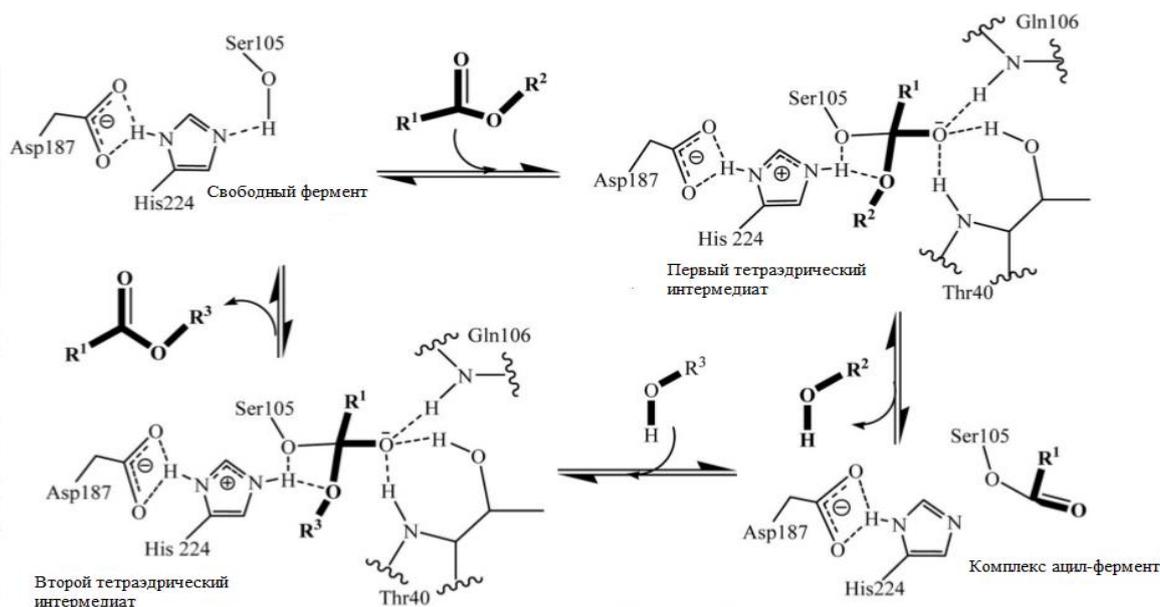


Рисунок 8. Механизм реакции, осуществляемый некоторыми карбогидратэстеразами: R1 – метильный радикал, R2 – сахар, R3 – водород (Hæffner and Norin, 1999).

Однако, для ферментов из семейства CE4 свойственен каталитический механизм (рис. 9), зависящий от катионов дивалентных металлов ($Zn^{2+}/Co^{2+}/Mg^{2+}$).

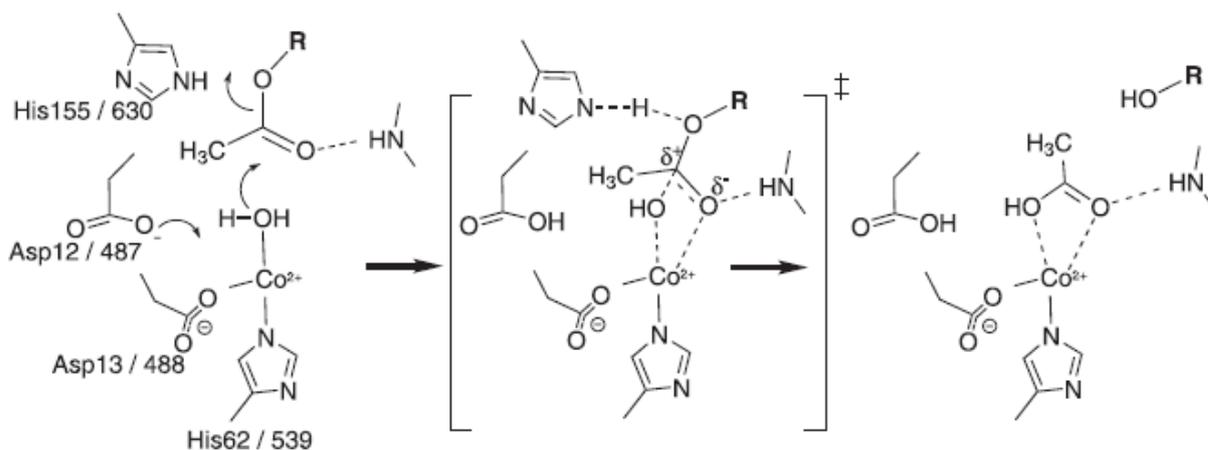


Рисунок 9. Механизм реакции, осуществляемый карбогидратэстеразами из семейства CE4 (Taylor et al., 2006).

Для второй группы ферментов на примере пектинметилэстеразы описан абсолютно другой механизм реакции (Fries et al., 2007): аспартат (178) образует водородную связь с атомом кислорода карбонильной группы; далее аспартат (199) атакует карбонильный атом углерода за счет отрицательного заряда с формированием тетраэдрического интермедиата с отрицательным зарядом на карбонильном кислороде. Этот негативный заряд стабилизируется

за счет взаимодействия с глутамином (177) и аспаратом (178). Далее метанол через ангидридный интермедиат замещается водой. Последующий гидролиз ангидрида катализируется аспаратом (178), и образуются конечные продукты: деметилированная галактуроновая кислота и свободный фермент.

3.3.4. Классификация CAZymes

С 1984 года для классификации ферментов использовалась IUBMB номенклатура (International union of biochemistry and molecular biology – Международный союз биохимии и молекулярной биологии) – классификация ферментов, основанная на типе катализируемой реакции и субстратной специфичности фермента (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>). Эта номенклатура оказалась очень полезной, т.к. позволяла избегать беспорядка и накопления разных тривиальных названий для одних и тех же ферментов, обеспечивая единую классификацию. Однако такая классификация не отражает структурные особенности ферментов и их эволюцию, благодаря чему в одно семейство могут попасть гомологичные (родственные) и аналогичные (неродственные, но приобретшие в ходе конвергенции одинаковую активность) белки. Кроме того, такая классификация мало применима к ферментам с широкой субстратной специфичностью.

К тому времени уже было ясно, что существует прямая взаимосвязь между сходством аминокислотных последовательностей, сходством фолдинга белков (Chothia and Lesk, 1986) и их активностью. В связи с этим, а также благодаря развитию технологий секвенирования и появлению информации о большом количестве последовательностей различных белков, в частности, гликозидаз, в 1991 году появляется первая классификация гликозидаз (Henrissat, 1991), основанная на сходстве аминокислотных последовательностей ферментов, что позволило предсказать их родство и объединить на этом основании в различные семейства. Изначально в базу данных входила 301 последовательность, соответствующая 30 активностям согласно номенклатуре IUBMB (К.Ф. – код фермента); они были определены в 35 семейств, причем из них только 18 содержали ферменты с одинаковой активностью, а остальные 17 содержали различные по катализируемым реакциям белки. В 1998 году на основе этой классификации появляется база данных CAZy, в которой собраны данные о структурных и биохимических особенностях гликозидаз, полисахаридлиаз, углеводэстераз, гликозилтрансфераз а также углеводов-связывающих доменов (<http://www.cazy.org/>). На 2022 год в данной базе содержится 1088916 последовательностей; они отнесены к 173 семействам (GH1-GH173), однако некоторое количество последовательностей (27915) до сих пор не удается отнести к какому-либо семейству (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>).

Многие из этих семейств объединены в кланы, которые формируются в зависимости от третичной структуры белков и строения каталитического домена; распределение гликозидаз по кланам представлено в таблице 2. Гликозидазы гидролизуют практически все известные олиго- и полисахариды. У представителей одних и тех же семейств GH могут быть как одинаковые (например, все известные представители GH47 – альфа-маннозидазы), так и разнообразные активности. Некоторые семейства GH являются крайне разнообразными и позволяют расщеплять большое количество разных олиго- и полисахаридов. Так, среди представителей семейства GH5 известны эндо-бета-1,4-глюканазы, бета-глюкозидазы, эндо-бета-1,4-ксилазазы, эндо-бета-1,4-манназазы и некоторые другие.

Таблица 2.Кланы родственных семейств гликозидаз

Клан	Тип каталитического домена	Механизм	Семейства гликозидаз (GH)
GH-A	(β/α) ₈ -бочонок	β -сохраняющий	1, 2, 5, 10, 17, 26, 30, 35, 39, 42, 50, 51, 53, 59, 72, 79, 86, 113, 128, 148, 157, 158
GH-B	β -сэндвич	β -сохраняющий	7, 16
GH-C	β -сэндвич	β -сохраняющий	11, 12
GH-D	(β/α) ₈ -бочонок	α -сохраняющий	27, 31, 36
GH-E	6-лопастной β -пропеллер	α -сохраняющий	33, 34, 83, 93
GH-F	5-лопастной β -пропеллер	β -обращающий	43, 62
GH-G	(α/α) ₆ -бочонок	α -обращающий	37, 63, 100, 125
GH-H	(β/α) ₈ -бочонок	α -сохраняющий	13, 70, 77
GH-I	($\alpha+\beta$)-лизозимное ядро	β -обращающий	24, 80
GH-J	5-лопастной β -пропеллер	α -сохраняющий	32, 68
GH-K	(β/α) ₈ -бочонок	β -сохраняющий	18, 20, 85
GH-L	(α/α) ₆ -бочонок	α -обращающий	15, 65
GH-M	(α/α) ₆ -бочонок	β -обращающий	8, 48
GH-N	β -спираль	α -обращающий	28, 49
GH-O	(α/α) ₆ -бочонок	β -сохраняющий	52, 116
GH-P	(α/α) ₆ -бочонок	β -сохраняющий	127, 146
GH-Q	(α/α) ₆ -бочонок	β -обращающий	94, 149, 161
GH-R	(β/α) ₈ -бочонок	α -сохраняющий	29, 107

Классификация полисахаридлиаз в CAZy аналогична классификации гликозидаз, то есть в ее основе лежит сходство аминокислотных последовательностей ферментов. В настоящий момент 36142 последовательности полисахаридлиаз отнесены к 42 семействам (PL1-PL42) и 1964 последовательности не удалось отнести к какому-либо семейству согласно базе данных CAZy (<http://www.cazy.org/Polysaccharide-Lyases.html>). Среди полисахаридлиаз наиболее многочисленны пектатлиазы (PL1-PL3, PL9, PL10, PL22), рамногалактуронанлиазы (PL4, PL11, PL26), альгинатлиазы (PL5, PL6, PL7, PL14, PL15, PL17, PL18, PL32, PL34, PL36) и лиазы, расщепляющие сульфатированные полисахариды (PL8, PL12, PL13, PL16, PL21, PL23-PL25, PL28-PL30, PL33, PL35).

Согласно базе данных CAZy углеводэстеразы разделяют на 20 семейств (CE1-CE20, <http://www.cazy.org/Carbohydrate-Esterases.html>). В основном среди углеводэстераз распространены ацетилксиланэстеразы (CE1-CE7, CE12), хитиндеацетилазы (CE4), пептидогликандеацетилазы (CE4), пектинметилэстеразы (CE8), рамногалактуронанацетилэстеразы (CE12) и ферменты, катализирующие N-деацетилирование N-ацетилглюкозамин-6-фосфата (CE9) и хитобиозы (CE14) (Biely, 2012).

3.4. Пути запасания энергии у гетеротрофных планктомицетов

Долгое время считалось, что все представители *Planctomycetia* и *Physcisphaerae* являются облигатно аэробными микроорганизмами и им свойственны катаболические пути, типичные для аэробных хемоорганотрофов. Так, для планктомицетов, например, *Rhodospirillum rubrum* (Glockner et al., 2003; Gade et al., 2005), *Paludisphaera borealis* (Ivanova et al., 2017), *Fimbriiglobus ruber* (Ravin et al., 2018), показано наличие всех генов, необходимых для проведения реакций гликолиза, цикла трикарбоновых кислот, пентозо-фосфатного пути. Комплексы аэробной электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) и генерации трансмембранного потенциала у *Planctomycetia* могут быть представлены НАДН-дегидрогеназой, цитохром:хинол-оксидоредуктазой и цитохром с-оксидоредуктазой (Glockner et al., 2003).

Однако недавние исследования показали, что планктомицеты способны также к брожению (Glockner et al., 2003; Fukunaga et al., 2009; Kovaleva et al., 2015; Slobodkina et al., 2015; Spring et al., 2018) и анаэробному дыханию (Slobodkina et al., 2015; Slobodkina et al., 2016). При этом во всех случаях способность бродить у того или иного планктомицета сопровождалась способностью того или иного типа дыхания, однако для представителей недавно описанного порядка *Sedimentisphaerales* (Spring et al., 2018) было впервые показано отсутствие роста с использованием как аэробного, так и анаэробного дыхания, что делает их

облигатными бродильщиками. Для большинства известных факультативно-анаэробных планктомицетов данных по детерминантам брожения и анаэробного дыхания практически нет, что связано с тем, что исследований, посвященных детальному анализу путей запасания энергии у *Planctomycetes*, крайне мало.

ГЛАВА 4. ЭКОЛОГИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ *ПЛАНТОМИЦЕТЫ*

Первые культивируемые планктомицеты были выделены из водных экосистем, неотъемлемой частью которых они являются. Однако их распространение в других местообитаниях долгое время оставалось неизвестным, поскольку на начальных этапах развития молекулярной экологии не удавалось детектировать их в сообществах из-за сильного несовпадения универсальных бактериальных праймеров к последовательности гена 16S рРНК и последовательностей данного гена у планктомицетов.

Позднее после создания более совершенных праймеров, постепенного развития технологий высокопроизводительного секвенирования, и накопления работ по изучению микробных сообществ различных экосистем стало понятно, что планктомицеты являются повсеместно распространенной группой микроорганизмов (Wiegand et al., 2018). В целом, предполагается, что планктомицетам часто свойственно быть прикрепленным к различным частицам, находиться в осадках и в биопленках (Wiegand et al., 2018), что может помочь в выборе образцов и подборе условий для выделения новых планктомицетов.

Так, планктомицеты присутствуют в различных почвах (Buckley et al., 2006). В некоторых типах почв они также представляют одну из значимых составляющих микробного сообщества, например, в почве мангровых лесов (приливно-отливная зона) доля планктомицетов может составлять 1.39-5.62% от всех бактерий (Yun et al., 2017); в почвах сельскохозяйственных полей – 4.76% (She et al., 2017) – 10.84% (Niu et al., 2016); в лесных почвах – 13-16% (Ivanova et al., 2016), 21% (Yarwood and Hogberg, 2017). По некоторым данным планктомицеты входят в число пяти доминирующих филумов обнаруживаемых в почвах (рис. 10, Delgado-Baquerizo et al., 2018).

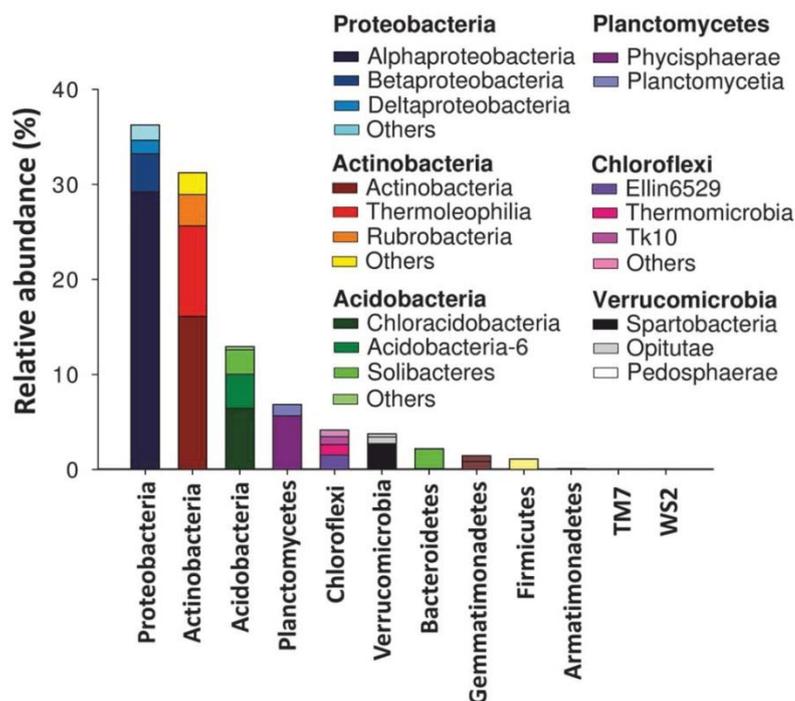


Рисунок 10. Таксономический состав доминирующих филофитов (2% филофитов, в среднем представляющих ~40% от всех последовательностей), обнаруживаемых в почвах (Delgado-Baquerizo et al., 2018).

Несмотря на то, что присутствие планктомицетов в морях и пресных водоемах было обнаружено давно, остается еще много вопросов об их разнообразии и численности. Результаты различных молекулярно-экологических работ показали их важную роль в сообществах пресноводных местообитаний (Brummer et al., 2004). Они оказались одной из самых массовых групп микроорганизмов, обитающих в реках бассейна Амазонки (Satinsky et al., 2015; Santos-Junior et al., 2017) и ультрапресных северных болот (Dedysh and Ivanova, 2019). Они также составляют значительную долю сообщества морских отложений – до 7% в Средиземном море (Lopez-Perez et al., 2016), до 8% в Северном море (Probandt et al., 2018).

Еще одной нишей, где часто обнаруживаются *Planctomycetes* – это микробиомы простейших, водорослей, растений и животных. Так, планктомицеты составляют ~10% от всех микроорганизмов, обитающих в симбиозе с морскими фораминиферами (Prazenes et al., 2017) и губками (Sipkema et al., 2009). Кроме того, *Planctomycetes* были одной из доминирующих фил микробиома кораллов *Montastraea cavernosa* (Jarret et al., 2017) и *Paramuricea placomus* (Kellog et al., 2016). Очень часто планктомицеты детектируются в биопленках на поверхности водорослей, представляя от 1% до 50% всего микробного сообщества (Morris et al., 2006; Bengtsson and Ovreas, 2010; Bondoso et al., 2017). Также планктомицеты могут быть частью микробиома кишечника животных, включая насекомых (Kohler et al., 2008), рыб (Li et al., 2014) и млекопитающих (Leser et al., 2002; Frey et al., 2006; Cayrou et al., 2013).

Представители *Planctomycetes* обнаруживаются и в термальных экосистемах, таких как наземные горячие источники в США (Йеллоустон, Hugenhlotz et al., 1998), Тайланде (Portillo et al., 2009) и Китае (Тибет, Lau et al., 2009). Однако до 2015 года не было выделено ни одной чистой культуры термофильных планктомицетов. Первыми планктомицетами, выделенными из горячих источников стали а) *Tepidisphaera mucosa*, выделенный из наземного горячего источника в районе озера Байкал (Kovaleva et al., 2015), б) *Thermogutta terrifontis* и в) *Thermogutta hypogea*, выделенные из наземного горячего источника на острове Кунашир и потока термальной воды в шахте Беатрикс, ЮАР (Slobodkina et al., 2015). Кроме необычного места обитания эти микроорганизмы отличались от мезофильных родственников способностями к брожению (Kovaleva et al., 2015; Slobodkina et al., 2015), а *Thermogutta* была способна и к анаэробному дыханию (Slobodkina et al., 2015), что может быть обусловлено пониженным содержанием кислорода в воде горячих источников. Позже был описан еще один термофильный представитель *Planctomycetes* *Thermostilla marina* (Slobokina et al., 2016), который был выделен из морской гидротермы и являлся факультативным анаэробом. Тем не менее, несмотря на несомненные успехи по изучению разнообразия термофильных планктомицетов, можно смело сказать, что сделаны только первые шаги к полному пониманию распространения и роли планктомицетов в горячих источниках. Так, согласно базе данных Silva SSU Ref NR из примерно 9 тысяч последовательностей гена 16S рРНК *Planctomycetes* около 2.4% получены из термальных мест обитания. Это означает, что термофильных планктомицетов существует гораздо больше, чем известно сейчас, и их число сравнимо с количеством всех видов планктомицетов, описанных на данный момент – 138 видов, включая некультивируемых анаммокс-бактерий.

ГЛАВА 5. ВОЗМОЖНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ПЛАНКТОМИЦЕТОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ

На данный момент единственная технология, где успешно используются планктомицеты – это очистка сточных вод от избытка аммонийного азота с помощью процесса анаммокс (Kartal et al., 2010), который осуществляют представители *Candidatus* “Brocadiae”.

Однако можно отметить еще два принципиально других направления, в которых могут применяться планктомицеты, принадлежащие к двум другим классам – *Planctomycetia* и *Phycisphaerae*. Во-первых, недавно было обнаружено, что в геномах планктомицетов содержится большое количество генных кластеров, ответственных за синтез вторичных метаболитов, в том числе возможных антимикробных соединений (Jeske et al., 2013). Позже была напрямую показана антимикробная активность экстрактов, полученных из некоторых планктомицетов, в том числе *Planctopirus limnophila* (Jeske et al., 2016), *Rhodopirellula baltica* (Graca et al., 2016; Jeske et al., 2016), *Rubinisphaera brasiliensis* (Graca et al., 2016) *Roseimaritima ulvae* (Graca et al., 2016). Эти находки соответствуют стратегии поиска новых антимикробных соединений в новых таксонах микроорганизмов. Во-вторых, поскольку планктомицеты имеют множество полисахарид-расщепляющих ферментов, то они могут послужить источником новых ферментов для биотехнологии. Так, уже были охарактеризованы сульфатаза (Wallner et al., 2005) и полисахаридлиаза (Dabin et al., 2008) из *Rhodopirellula baltica*, эстераза из *Thermogutta terrifontis* (Sayer et al., 2015), хитиназа из *Fimbriiglobus ruber* (Ravin et al., 2018), а также целлюлаза из *Telmatolcola sphagniphila* (Rakitin et al., 2021). Оба этих направления находятся пока в состоянии «гипотетическое применение», но являются неплохим теоретическим и практическим заделом для будущего прикладного скрининга биотехнологически перспективных соединений среди подавляющего большинства до сих пор некультивируемых планктомицетов.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 6. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

6.1. Объекты исследования

Для таксономического описания были использованы штаммы GM2012 и 2918, выделенные сотрудницей ИНМИ РАН Ковалевой О.Л. Кроме того, объектами исследования были накопительные и чистые культуры планктомицетов, выделенные из горячих источников в ходе этой работы. Для проведения геномного анализа использовали штаммы *Thermogutta terrifontis* R1 и *Tepidisphaera mucosa* 2842, выделенные Ковалевой О.Л.

6.2. Методы исследования

6.2.1. Отбор проб

Отбор проб из наземных горячих источников п-ова Чукотка и в районе озера Байкал проводили в августе 2016 г. и в августе 2017 г., соответственно. Пробы отбирали в 50 мл флаконы или 15 мл пробирки Хангейта с газонепроницаемыми пробками, которые заполняли до самого верха, герметично закрывали и транспортировали в лабораторию без охлаждения. Во время отбора были измерены значения температуры и pH в источниках.

6.2.2. Приготовление сред

Для получения накопительных культур с высоким содержанием планктомицетов была использована модифицированная среда Пфеннига с уменьшенной концентрацией минеральных солей. Культивирование проводили аэробно на модифицированной среде Пфеннига следующего состава (г л⁻¹):

MgCl ₂ *6H ₂ O	0.16 (0.11*)
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.16 (0.11*)
KCl	0.16 (0.11*)
NH ₄ Cl	0.16 (0.11*)
KH ₂ PO ₄	0.16 (0.11*)

*-концентрация солей в среде для накопительных культур, полученных из проб горячих источников Чукотки

Дополнительно в среду вносили 1 мл л⁻¹ р-ра витаминов (по Wolin et al., 1963) и 1 мл л⁻¹ р-ра микроэлементов (Кевбрин и Заварзин, 1992).

Раствор микроэлементов по Кевбрину и Заварзину, 1992 (мг л⁻¹):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (соль Мора)	784
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	238
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	395
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	24
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	144
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2
Na_2SeO_4	94
HBO_3	6
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	99

Раствор витаминов по Wolin et al., 1963 (мг л⁻¹):

биотин	20
фолиевая кислота	20
пиридоксин гидрохлорид	100
рибофлавин	50
тиамин	50
никотиновая кислота	50
пантотеновая кислота	50
B12	1
п-аминобензойная кислота	50
тиоктовая кислота	50

Большинство полисахаридов (крахмал, КМЦ, пектин, маннан, галактоманнан, глюкоманнан, ксилан, арабиноксилан, ксилоглюкан, арабинан, арабиногалактан, галактан, инулин, β -глюкан, пуллулан, лихенан, ламинарин, альгинат) вносили в среду до стерилизации (0.2%), за исключением ксантановой камеди, для которой готовили стерильный 1% стоковый раствор, который далее стерильно вносился в среду до конечной концентрации 0.05%. Моносахариды и дисахариды (глюкоза, ксилоза, сахароза, мальтоза, лактоза, целлобиоза, трегалоза, раффиноза, рамноза, манноза, фруктоза) вносили до конечной концентрации 0.2% с использованием стоковых растворов, полученных фильтрованием через фильтр с размером пор 0.22 мкм.

Для определения оптимального для роста pH в среду вносили определенный буфер до концентрации 0.01 М (pH 4.5-6.0 – ацетатный буфер; 6.5-8.0 – HEPES; 8.5, 9.0 – HEPBS) и доводили pH до нужных значений с помощью добавления 6М HCl или 3М NaOH.

Для определения оптимальной для роста температуры значение рН в среде доводили до оптимального с использованием соответствующего буфера, как было указано выше, и проводили культивирование при различных температурах 4°C, 14°C, 25°C, 30°C, 42°C, 54°C, 60°C, 65°C.

Среду разливали в пробирки Хангейта (по 5 мл среды), 50 мл флаконы (по 10 мл среды) или в 100 мл флаконы (по 15-20 мл среды) и стерилизовали при 1 АТИ. В каждую пробирку или флакон с помощью стерильного шприца вносили 1 V посевного материала к 100 V среды.

Для получения анаэробной среды ее кипятили в течение 10-15 мин и охлаждали на водяной бане под непрерывным током N₂ (с пробулькиванием газа). После охлаждения в среду добавляли витамины, микроэлементы и подводили рН до необходимого значения. Под током N₂ среду переливали в дозатор, далее разливали по пробиркам также под током N₂. Элементную серу (1 г л⁻¹) добавляли непосредственно в пробирки. Другие же акцепторы электронов вносили из стоковых растворов (пропущенные через фильтр 0.22 мкм) до концентрации: нитрат (10 мМ), нитрит (2 мМ), сульфат (10 мМ), тиосульфат (10 мМ), фумарат (10 мМ).

6.2.3. Оценка возможности роста в различных условиях

Возможность роста на различных субстратах, способности к брожению и анаэробному дыханию, а также оптимальные для роста штаммов значения температуры и рН определяли с помощью прямого подсчета клеток с использованием светового фазово-контрастного микроскопа Leica DM500. Инкубацию проводили от 3 до 14 суток.

6.2.4. Получение накопительных и чистых культур

Для получения накопительных культур с доминированием целевых групп микроорганизмов изменяли условия культивирования – варьировали температуру, рН, субстраты, соленость, а также вносили антибиотики (ампициллин, стрептомицин) для подавления быстрорастущих сопутствующих бактерий. Для получения чистых культур использовали метод десятикратных предельных разведений. Чистоту культуры проверяли микроскопией культур, выращенных на богатых средах, и секвенированием гена 16S рРНК, а также полногеномным секвенированием.

6.2.5. Электронная микроскопия

Данный этап работы был проведен совместно с ЦКП «Коллекция UNIQEM» ФИЦ Биотехнологии РАН. Исследование тонкого строения клеток с использованием негативного

контрастирования ФВК и получение ультратонких срезов проводили согласно Bonch-Osmolovskaya et al., 1990.

6.2.6. Хемотаксономический анализ

Хемотаксономический анализ проводили совместно с к.х.н. Новиковым А.А. (РГУ нефти и газа имени И.М. Губкина). Анализ состава жирных кислот проводили, как описано в Zhilina et al., 2012.

6.2.7. Выделение ДНК/РНК

Выделение ДНК из накопительных культур и чистых культур для секвенирования гена 16S рРНК проводили с использованием фенол-хлороформной экстракции с модификациями согласно Gavrilo et al., 2016. Выделение ДНК для секвенирования генома *Thermogutta terrifontis* R1 проводили также согласно Gavrilo et al., 2016.

Геномная ДНК из *Tepidisphaera mucosa* 2842 и *Tautonia sociabilis* GM2012 и *Thermogemma fonticola* 2918 была выделена методом фенол-хлороформной экстракции согласно Park, 2007.

Для получения транскрипта клетки *T. terrifontis* R1 были выращены на среде с добавлением трегалозы и ксантана в трех повторностях. Далее клетки всех трех повторностей каждого варианта были использованы для выделения тотальной РНК. Для выделения РНК использовали TRI-реагент (Sigma) и следовали стандартному протоколу с двумя циклами заморозки/разморозки и двукратной промывкой 75% этанолом. Осадок РНК был растворен в воде, не содержащей РНКаз (RNAase-free).

6.2.8. Секвенирование и сборка геномов, транскрипта

Геном *Thermogutta terrifontis* R1 был секвенирован с использованием комбинации технологий Illumina GA II и Roche/454 совместно с коллегами из Института Биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН (Кадников В.В.) и Университета Копенгагена (Menzel P.). Парноконцевые 500 п.о. ДНК библиотеки Illumina и одноконцевые библиотеки для пиросеквенирования были сконструированы и секвенированы согласно рекомендациям производителя. Гибридную сборку проводили с использованием Newbler (Margulies et al., 2005). Далее была дополнительно сконструирована и секвенирована 2 kb mate-pair библиотека Illumina для сборки в один скаффолд с использованием пакета Phred/Phrap/Consed (Gordon et al., 1998). Финальная сборка была проверена вручную. Итоговое покрытие генома составило x320. В финальной сборке удалось получить кольцевую хромосому.

Выделенная РНК была обратно транскрибирована в кДНК обратной транскриптазой. Тотальная кДНК была секвенирована на платформе Illumina с использованием PE ДНК библиотеки. Прочтения были картированы на геномную последовательность с помощью BWA v 0.7.8 (Li and Durbin, 2009). Сопоставление прочтений кДНК и генов было осуществлено с использованием пакета Subread (Liao et al., 2013). Дифференциальная экспрессия генов между двумя образцами (ксантан и трегалоза) была измерена edgeRun (Dimont et al., 2015). Уровень экспрессии гена считался различным в двух образцах, если P-value с поправкой Бенджамини-Хохберга был меньше 0.05.

Для секвенирования генома *Tepidisphaera mucosa* 2842, которое проводили совместно с коллегами из БФУ им. Канта (Тоцаков С.В.), парноконцевые библиотеки Illumina были подготовлены с использованием набора Nextera™ fragment library (Illumina Inc., USA). Секвенирование с использованием MiSeq™ (Illumina Inc., USA) позволило получить 1789467 пар прочтений длиной 250 п.о. Контроль качества и первичную обработку полученных прочтений проводили при помощи пакета CLC Genomics Workbench 10.0. Исходная сборка была получена с использованием CLC *de novo* assembler. Разрывы в контигах генома были закрыты GapFiller v1.11 (Boetzer and Pirovano, 2012), далее контиги были пересобраны с использованием SSPACE v.2.0 (Boetzer et al., 2011). На следующем этапе проводили окончательную ориентацию полученных контигов друг относительно друга при помощи ПЦР и праймеров, комплементарных концам контигов. Полученные ампликоны были секвенированы по Сэнгеру на оборудовании ABI 3730XL DNA analyzer (Life Technologies, USA).

Парноконцевые 250 п.о. ДНК библиотеки для секвенирования генома *T. sociabilis* GM2012 были приготовлены с использованием набора NEBNext Ultra DNA library preparation (New England Biolabs, USA) и секвенированы на MiSeq™ (Illumina Inc., USA). После секвенирования все прочтения были отфильтрованы по качеству с использованием CLC Genomics Workbench 10.0. Адаптеры были удалены SeqPrep (<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>). Сборка *de novo* была осуществлена использованием SPADES 3.10.0 (Bankevich et al., 2012). Среднее покрытие генома составило 39.52×, скаффолды с низким покрытием были исключены из финальной сборки. Финальная сборка содержала 133 контига.

Геномная ДНК штамма 2918 была фрагментирована NEBNext®dsDNA Fragmentase (New England Biolabs) в течение 15 минут; затем с использованием гель-электрофореза были получены фрагменты длиной 400-700 нуклеотидов. Парноконцевые 250-п.о. ДНК библиотеки были приготовлены из фрагментированной геномной ДНК с использованием набора NEBNext UltraDNA library preparation kit (New England Biolabs). Полученная библиотека была

секвенирована на приборе MiSeq (Illumina Inc.). Адаптеры были удалены с использованием SeqPrep tool (<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>). Прочтения были отфильтрованы по качеству в CLC Genomics Workbench 10.0 (Qiagen, Germany). Суммарно 658 659 пар прочтений были использованы для *de novo* сборки генома в Unicycler v 0.4.8 (Wick et al., 2017). Финальная сборка содержит 61 контиг.

6.2.9. Филогенетический анализ

Нуклеотидные последовательности выравнивали с использованием MAFFT (G-INS-i метод), если последовательностей было менее 200, и MAFFT (FFT-NS-2 метод) – если больше (Kato et al., 2017).

Аминокислотные последовательности были выровнены в MAFFT (G-INS-i) для конкатенированных последовательностей из множества белков, или Muscle – в случае отдельных белков (Edgar et al., 2004).

Для идентификации и выравнивания консервативных белков из набора bac120 (Parks et al., 2017) был использован инструмент gtdb-tk (Parks et al., 2018). Далее, при необходимости проводилась обработка полученных выравниваний с использованием Gblocks v.0.9 (Castresana, 2000) или trimAL v.1.4.1 (Capella-Gutierrez et al., 2009).

Построение филогенетических деревьев проводили методом максимального правдоподобия в MEGA7 (Kumar et al., 2016) или RAxML v.8.2.12 (Stamatakis, 2014) – для деревьев, основанных на очень длинных последовательностях (например, анализ, основанный на белках bac120), или если анализируемые последовательности были крайне многочисленны. Для нуклеотидных последовательностей использовали модель General Time Reversible, а для аминокислотных – LG (Le and Gascuel, 2008). Для оценки статистической достоверности узлов был использован bootstrap тест (1000 повторений, Felsenstein, 1985).

6.2.10. Геномный анализ

Для начальной автоматической аннотации геномов использовали серверы RAST (Aziz et al., 2008) или IMG (Chen et al., 2019). Для более точного определения функций белков были использованы различные базы данных UniProt, Pfam 27.0 (Finn et al., 2014), COG 2003-2014 (Galperin et al., 2015), CAZy/dbCAN – для детекции генов CAZymes (Lombard et al., 2014; Yin et al., 2012) и некоторые другие. Предсказание локализации белка проводили с использованием нескольких серверов SignalP 4.1. – для предсказания наличия сигнальной последовательности (Petersen et al., 2011), TMHMM 2.0 – для определения наличия мембранных доменов (Krogh et al., 2001), SecretomeP – для определения возможности неклассической секреции (Bendtsen et al., 2004). Для детальной *in silico* реконструкции

метаболизма предполагаемые функции были проверены вручную с использованием BLAST против курируемой базы данных белков SwissProt (Bairoch et al., 2004), а также филогенетическими методами.

Для сравнительного анализа, основанного на полногеномных последовательностях, использовали: модуль pyani v 0.2.7 (Pritchard et al., 2016) для вычисления ANI; AAI-matrix калькулятор (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/g-matrix/index>) – для вычисления AAI и Genome-to-Genome Distance Calculator 2.1 (Meier-Kolthoff et al., 2013) – для вычисления ДНК-ДНК гибридизации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 7. ВЫДЕЛЕНИЕ НОВЫХ ПЛАНКТОМИЦЕТОВ, ОБИТАЮЩИХ В ГОРЯЧИХ ИСТОЧНИКАХ

Для постановки накопительных культур с целью выделения новых чистых культур планктомицетов был выбран ряд горячих источников полуострова Чукотка, образцы из которых были отобраны в ходе экспедиции в августе 2016 г, и района озера Байкал, пробы из которых были получены в ходе экспедиции в августе 2017 г (см. Таблица 3). Нами были подобраны источники с нейтральным значением рН, умеренно-высокими температурами (45-70 °С), наличием в образце микробных матов/обрастаний.

Таблица 3. Характеристики горячих источников, образцы из которых использовали в качестве инокулята для постановки накопительных культур.

Номер пробы	Тип образца	Т, °С	рН	Местоположение
3702	маты (волокна), осадок, вода	67	7.0	Мечигменские источники (Чукотка) N65.80634/W173.39541
3708	вода, бурые и серо-зеленые осадки со дна	79	6.7	Мечигменские источники (Чукотка) N65.806312/W173.39619
3713А	розовые маты, вода	54	7.3	Мечигменские источники (Чукотка) N65.806362/W173.39634
3720	обрастания, осадки со дна и вода	61	6.5	Мечигменские источники (Чукотка) N65.806351/W173.3984
3726	черный осадок и вода	62	6.8	Мечигменские источники (Чукотка) N65.805696/W173.39655
3733А	маты и вода	74	6.9	Мечигменские источники (Чукотка) N65.806592/W173.38869
3738	розовые маты, песок со дна и вода	59-61.4	8.0	Сенявинские источники (Чукотка) N64.736698/W172.84875
3753	бледно-розовые маты и вода	59	6.8	Чаплинские источники (Чукотка) N64.43566/W172.52135
В1	серо-бежевый осадок	44.5	6.0-7.5	Горячинск (р-н оз. Байкал) N52.98731/W108.30781
В2	песок из основного потока воды	53.5	7.0	
В3	вода	56	7.0	

С использованием вышеуказанных образцов в качестве посевного материала, были поставлены накопительные культуры с добавлением различных полисахаридов в качестве единственного источника углерода и энергии (Таблица 4).

Таблица 4. Параметры культивирования, используемые для накопления планктомицетов.

Образец	T, °C	pH	Субстраты
3702	60	7.0	ксилоглюкан (XylG) ксантановая камедь (XG) галактан (Gal) пектин (Pec)
3708	70		
3713A	54		
3720	60		
3726	60		
3733A	70		
3738	60		
3753	60		
B1	47		
	54		
B2	47	ксилоглюкан (XylG) ксантановая камедь (XG) пектин (Pec)	
	54		
B3	47		
	54		

Из всех вариантов накопительных культур лишь в нескольких при микроскопировании можно было обнаружить характерные клетки коккоидной формы, визуально сходные с известными планктомицетами: крупные (сходные с *Planctomycetia*) и мелкие (сходные с *Phycisphaerae*). Накопительные культуры 3702, 3720 и 3726 с ксилоглюканом, 3753 и B2 (54 °C) с ксантановой камедью, в которых клетки с характерной для планктомицетов морфологией доминировали, были выбраны для дальнейшей работы. Из них была выделена ДНК и получены профили фрагментов гена 16S рРНК (рис. 11). Действительно, во всех доминировали планктомицеты, при этом в накопительных культурах 3702XylG, 3720XylG, 3726XylG и 3753XG одним из доминирующих таксонов был род *Thermogutta*, он составлял от 28% до 74% от всего разнообразия прокариот. В отличие от других накопительных культур, накопительная культура B-254 была проанализирована после нескольких дополнительных пересевов, поэтому в ней больше 90% последовательностей принадлежат к новому таксону родового уровня в порядке *Tepidisphaerales*.

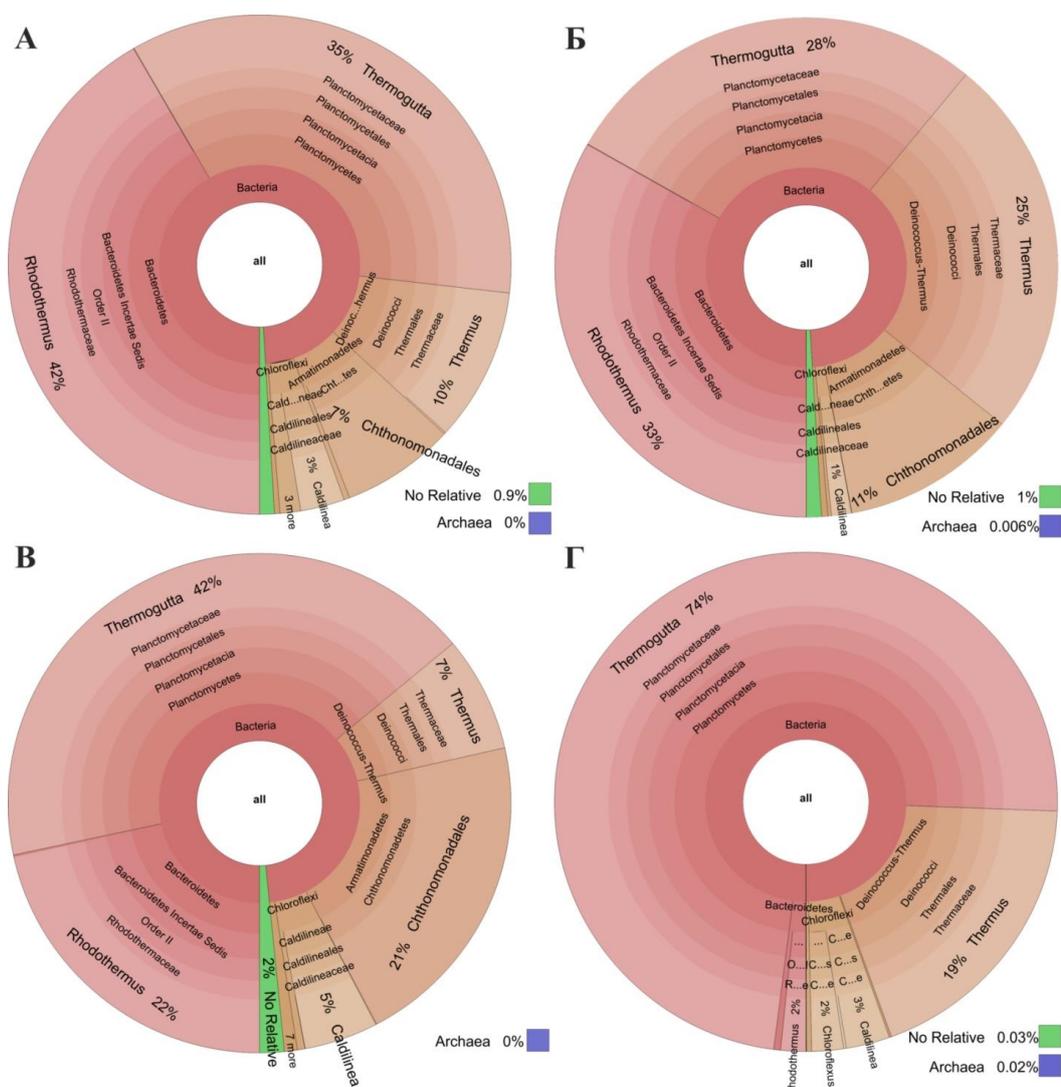


Рисунок 11. Профили фрагментов гена 16S рРНК, полученные из накопительных культур: А – 3702XylG, Б – 3720XylG, В – 3726XylG, Г – 3753XG.

Из всех пяти выбранных накопительных культур были выделены чистые культуры с помощью добавления антибиотиков (ампициллина – для 3702XylG, 3720XylG, 3726XylG и 3753XG, и стрептомицина – для В-254) и серии десятикратных разведений (10^{-1} - 10^{-9}). Чистоту культур проверяли микроскопически при выращивании на богатой среде, а также секвенированием полного гена 16S рРНК.

Все штаммы, выделенные из горячих источников Чукотки (3702XylG, 3720XylG, 3726XylG и 3753XG), оказались сходны морфологически между собой (рис. 12) и очень близки к *Thermogutta terrifontis* R1 (99-100% сходства по последовательности гена 16S рРНК), являясь, скорее всего, новыми штаммами этого же вида.

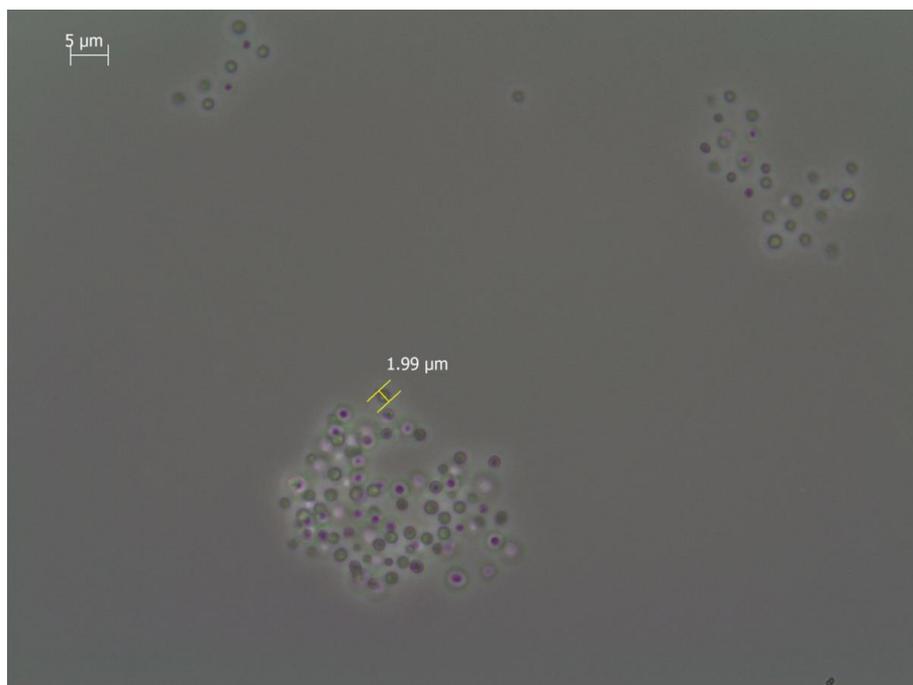


Рисунок 12. Морфология клеток штамма 3702XylG при просмотре препарата под фазово-контрастным микроскопом.

Последовательность гена 16S рРНК штамма В-254, выделенного из горячего источника в районе озера Байкал, обладала 91.26% и 90.67% сходства с ближайшими описанными родственниками, представителями порядка *Tepidisphaerales* – *Tepidisphaera mucosa* 2842 и “*Humisphaera borealis*” М1803, соответственно, что позволяет предположить, что данный штамм является представителем нового рода в порядке *Tepidisphaerales*. Клетки штамма В-254 были грамотрицательными, подвижными кокками диаметром 0.6–1 мкм. Штамм рос при 30–54 °С и при диапазоне рН 5.1–8.4 с оптимумом 50–54 °С и рН 6.6–7.1. Штамм В-254 рос хемоорганогетеротрофно с моно-, ди- и полисахаридами (ксилан, крахмал, галактан, галактоманнан, ксилоглюкан, арабинан, курдлан, бета-глюкан, ксантановая камедь) в качестве источника углерода и энергии. В анаэробных условиях штамм был способен к брожению, но не к дыханию. Для данного штамма было предложено имя “*Fontivita pretiosa*”.

Несмотря на то, что только один из выделенных в ходе данной части работы штаммов представляет новый таксон термофильных планктомицетов, анализ филогенетического состава накопительных культур показывает, что выбранные условия, а именно пониженная минерализация среды и внесение полисахаридов в качестве ростового субстрата, позволяют получить сообщества, обогащенные планктомицетами – больше 20% от состава сообщества.

ГЛАВА 8. ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ ШТАММОВ ПЛАНКТОМИЦЕТОВ GM2012 И 2918

Сотрудницей ИНМИ Ковалевой О.Л. были выделены два новых штамма планктомицетов GM2012 и 2918 из проб, отобранных из термальной воды в золотой шахте Таутона (ЮАР) и из горячего источника около р. Карымша (п-ов Камчатка, РФ), соответственно. Физико-химические условия в местах отбора проб представлены в таблице 5.

Таблица 5. Характеристики местообитаний штаммов GM2012 и 2918

Штамм	Тип образца	T, °C	pH	Местоположение
GM2012	розовый мат и вода	42	8.0	шахта Таутона (ЮАР) S26.41611/ E27.42750
2918	смесь воды и осадков	52	5.2	река Карымша (Камчатка, РФ) N52.81110/ E158.09182

8.1. Описание штамма GM2012 – представителя нового рода и вида *Tautonia sociabilis*

8.1.1. Фенотипическая характеристика штамма GM2012

Клетки штамма GM2012 представлены неподвижными коккоидными клетками, 1.7-2.9 мкм в диаметре; могут встречаться в виде одиночных клеток, пар или образовывать крупные бесформенные агрегаты (рис. 13А), делятся почкованием (рис. 13Б). Ультратонкие срезы указывают на грамотрицательный тип клеточной стенки, так как отсутствует видимый слой пептидогликана (рис. 13Б).

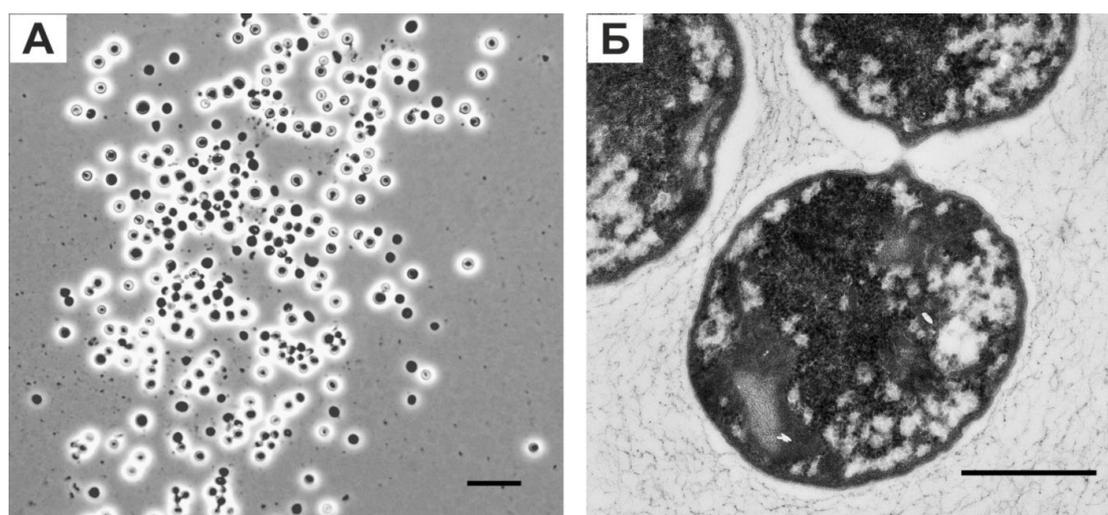


Рисунок 13. Морфология клеток GM2012: А – морфология клеток при использовании фазово-контрастного микроскопа, Б – ультратонкий срез клеток. Масштаб 10 мкм и 1 мкм, соответственно.

Штамм GM2012 рос в диапазоне температур от 37 °С до 46 °С; рост при 30 °С и ниже, а также при 50 °С и выше не наблюдался, таким образом, изолят является термотолерантным. Диапазон значений pH, при которых наблюдался рост, составлял от 5.5 до 9.0; рост при значениях pH 5.0 и ниже, а также 9.5 и выше не наблюдался. Оптимальными условиями роста штамма GM2012 являлись 42 °С и pH 7.5-7.7. Штамм не требовал для роста NaCl, однако мог выдерживать до 3% (m/V) NaCl в среде (оптимум 0% NaCl).

Штамм GM2012 являлся хемоорганогетеротрофом, как и другие известные представители класса Planctomycetia, и мог использовать ряд моно- и полисахаридов в качестве единственного источника углерода и энергии. Штамм мог расти на ксилوزه, глюкозе, маннозе, галактозе, мальтозе, лактозе, трегалозе, декстрине, крахмале и ксантановой камеди. Штамм не был способен утилизировать арабинозу, фруктозу, целлобиозу, сахарозу, раффинозу, дестран, ксилан, пектин, агарозу, ни одного из видов целлюлозы (микрористаллическая целлюлоза, КМЦ, фильтровальная бумага).

Рост в анаэробных условиях не проявлялся как при отсутствии внешнего акцептора электронов, так и при внесении акцептора электронов, отличного от кислорода: элементной серы (1 г л⁻¹), нитрита (2 мМ), нитрата (10 мМ), сульфата (10 мМ), тиосульфата (10 мМ), фумарата (10 мМ). Таким образом, штамм GM2012 является облигатным аэробом.

Тесты на реакции каталазы и оксидазы были отрицательными. Штамм был устойчив к воздействию пенициллина, ампициллина, амоксициллина, стрептомицина, но чувствителен к канамицину, полимиксину, ванкомицину и хлорамфениколу.

Основными жирными кислотами клеточных мембран были пальмитиновая (C16:0), стеариновая (C18:0) и олеиновая (C18:1 ω 9) кислоты, которые составляли 31.2%, 34.5% и 30.2% от общего количества, соответственно (Таблица 6).

Таблица 6. Состав жирных кислот мембран штамма GM2012

Жирная кислота	Длина цепи	Доля отобщего количества, %
C14:0	14.00	0.5
C15:0	15.00	0.4
C16:0	16.00	31.2
C17:1 ω 9	16.76	0.3
C17:0	17.00	0.7
C18:1ω9	17.76	34.5
C18:0	18.00	30.2
C19:0	19.00	0.2
C20:0	20.00	0.3
C22:0 разветвленный спирт	20.99	1.8

8.1.2. Анализ филогенетического положения и геномный анализ штамма GM2012

Геном штамма GM2012 был секвенирован и собран до 113 контигов общей длиной 6760005 п.о. Доля Г+Ц составляла 70.1 мол. %. Обнаружение в геноме генов (gene calling) и автоматическую аннотацию проводили с помощью NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (номер в Genbank –RYZH000000000).

Согласно поиску с использованием BLAST последовательность гена 16S рРНК штамма GM2012 имела 88-89% сходства с типовыми штаммами родов, входящих в семейство *Isosphaeraceae*: *Isosphaera pallida*, *Aquisphaera giovannonii*, *Singulisphaera acidiphila*, *Paludisphaera borealis* и *Tundrisphaera lichenicola*. Такой процент сходства находится ниже предлагаемого порога для разграничения родов прокариот – 94.5% (Yarza et al., 2014). Для определения точного филогенетического положения штамма был проведен филогенетический анализ, основанный на сравнении последовательностей гена 16S рРНК GM2012, всех чистых культур *Planctomycetes*, нескольких представителей анаммокс-кластера и *Verrucomicrobium spinosum* DSM 4136^T в качестве внешней группы (рис. 14). Анализ показал, что штамм GM2012 находится в корне семейства *Isosphaeraceae* и представляет новый таксон уровня рода.

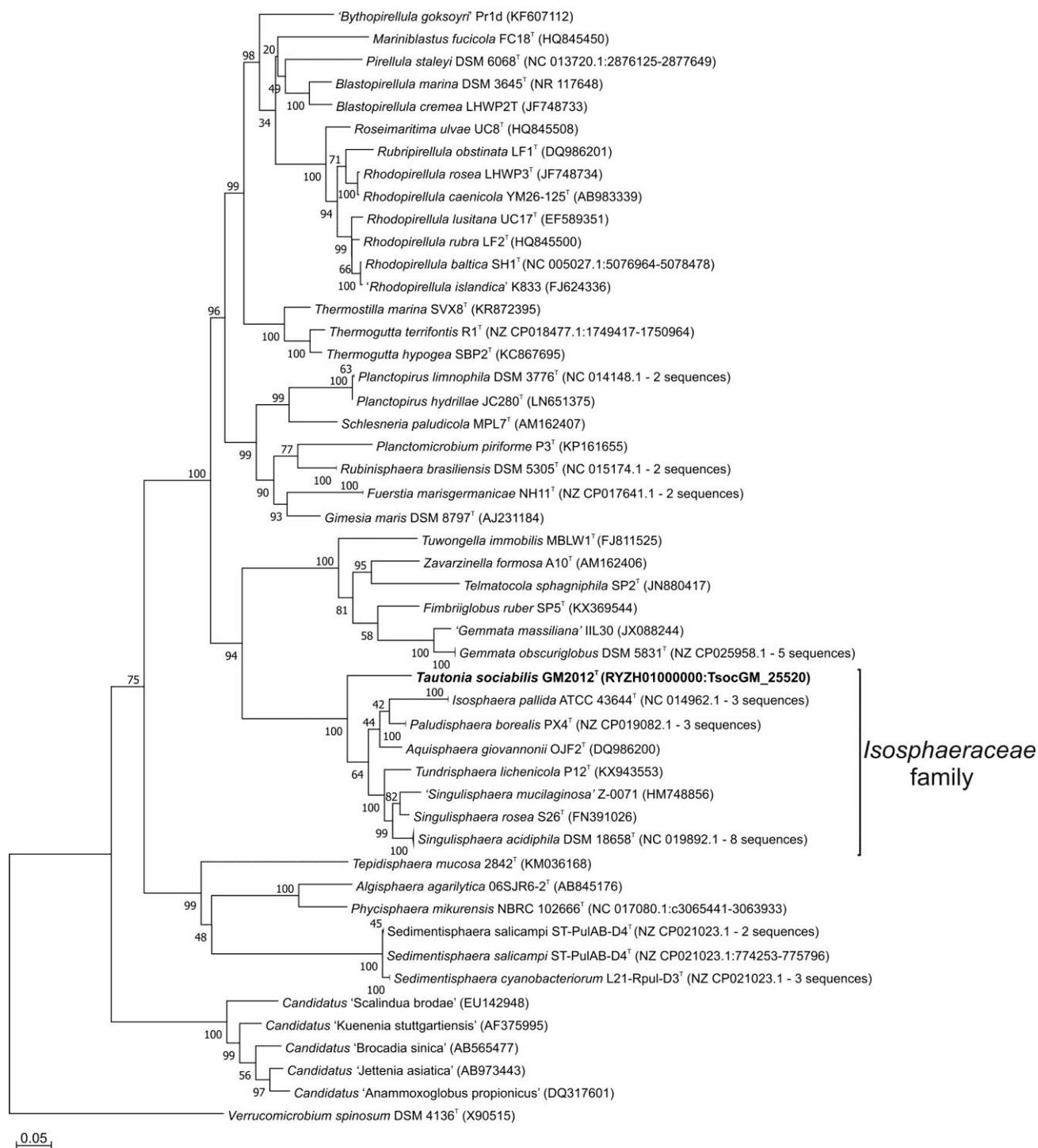


Рисунок 14. Филогенетическое дерево, основанное на сравнении последовательностей генов 16S рРНК, построенное методом максимального правдоподобия, показывающее положение штамма GM2012 (выделен жирным шрифтом) по отношению к другим представителям филума *Planctomycetes*. Длина ветвей соответствует числу замен на позицию с поправками, внесенными выбранной моделью (GTR, G + I, 4 категории). Все позиции с покрытием менее 95% были исключены. Суммарно 1308 позиций из 70 нуклеотидных последовательностей были в финальном наборе данных. Числа в узлах отражают процентное значение bootstrap теста (1000 повторений).

Определенная нами последовательность генома позволяет использовать дополнительные данные для выявления филогенетического положения изолята, основанные на сравнении геномных последовательностей штамма GM2012 и других представителей семейства *Isosphaeraceae*, геномы которых доступны в открытых базах данных: *Isosphaera pallida* ATCC 43644^T (NC_014962), *Singulisphaera acidiphila* DSM 18658^T (NC_019892) и *Paludisphaera borealis* PX4^T (NZ_CP019082). Филогенетический анализ, основанный на сравнении конкатенированных аминокислотных последовательностей 120 консервативных белков (Parks et al., 2017), показал топологию, сходную с 16S рРНК филогенией, подтверждая статус нового рода для штамма GM2012 (рис. 15).

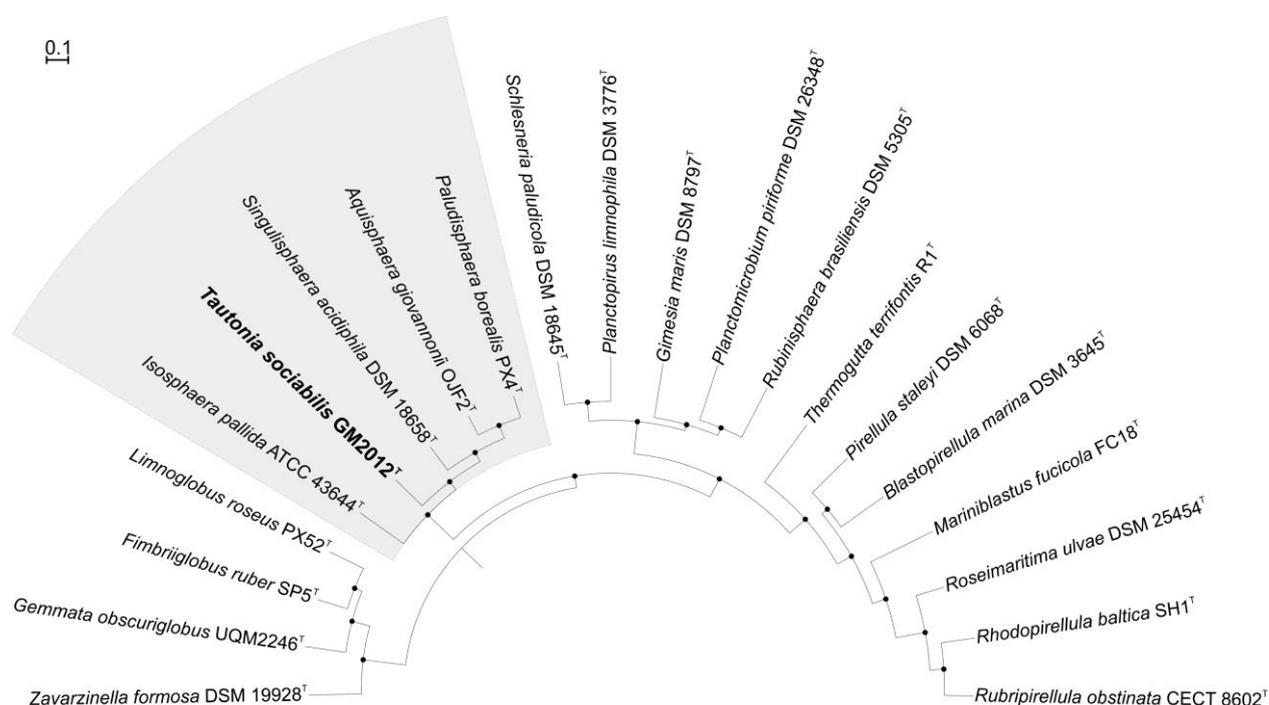


Рисунок 15. Филогенетическое дерево, основанное на сравнительном анализе 120 консервативных белков (bac120), построенное методом максимального правдоподобия, показывающее положение штамма GM2012 (выделен жирным шрифтом) по отношению к другим представителям класса *Planctomycetia* (серым сектором отмечены представители *Isosphaeraceae*). Длина ветвей соответствует числу замен на позицию с поправками, внесенными выбранной моделью (PROTGAMMALG). Черные круги в узлах отражают процентное значение bootstrap теста > 70% (1000 повторений).

Также нами были проведены сравнения ANI, AAI и *in silico* ДНК-ДНК гибридизации. Все расчеты показывают, что штамм GM2012 сильно отличается по этим параметрам от всех известных представителей семейства *Isosphaeraceae*: ANI (71-73%, Таблица 7), AAI (53-57%, Таблица 8) и ДНК-ДНК гибридизация (19-20%, Таблица 9), что хорошо согласуется с филогенетическим анализом.

Таблица 7. Попарное сравнение значений ANI (в процентах) в геномах штамма GM2012 и других представителей *Isosphaeraceae*

	<i>I. pallida</i> ATCC 43644 ^T	<i>P.</i> <i>borealis</i> PX4 ^T	<i>T. sociabilis</i> GM2012	<i>S. acidiphila</i> DSM 18658 ^T
<i>I. pallida</i> ATCC 43644 ^T	100	72	72	71
<i>P. borealis</i> PX4 ^T	72	100	73	74
<i>T. sociabilis</i> GM2012	71	73	100	72
<i>S. acidiphila</i> DSM 18658 ^T	72	74	72	100

Таблица 8. Попарное сравнение значений AAI (в процентах) в геномах штамма GM2012 и других представителей *Isosphaeraceae*

	<i>I. pallida</i> ATCC 43644 ^T	<i>P.</i> <i>borealis</i> PX4 ^T	<i>T. sociabilis</i> GM2012	<i>S. acidiphila</i> DSM 18658 ^T
<i>I. pallida</i> ATCC 43644 ^T	100	52	53	52
<i>P. borealis</i> PX4 ^T	52	100	56	61
<i>T. sociabilis</i> GM2012	53	56	100	57
<i>S. acidiphila</i> DSM 18658 ^T	52	61	57	100

Таблица 9. Сравнение геномов, основанное на *in silico* ДНК-ДНК гибридизации; значения даны в процентах

	<i>I. pallida</i> ATCC 43644 ^T	<i>P. borealis</i> PX4 ^T	<i>S. acidiphila</i> DSM 18658 ^T
<i>T. sociabilis</i> GM2012	20	19	19

Функциональный анализ генома штамма GM2012 в первую очередь включал выявление количества и категорий COGs (Clusters of Orthologous Groups – кластеры ортологичных групп) путем отнесения каждого белок-кодирующего гена к определенному GOG, а также COG-категории. Всего 3104 из 4921 белков, определенных путем *in silico* трансляции генов генома штамма GM2012, были отнесены к 1482 COGs (рис. 16), при этом значительную часть (почти 50%) составляют белки с неизвестной или неточно предсказанной функцией (категории S и R). Такое количество белков с неизвестными функциями говорит о том, что метаболические сети планктомицетов еще крайне слабо изучены. Помимо категорий S и R, одной из самых многочисленных категорий является категория G (метаболизм и транспорт углеводов), к которой был отнесен 191 белок; такой результат четко коррелирует с данными, полученными в ходе ростовых экспериментов, выраженными в способности данного микроорганизма расти на большом числе углеводов (см. 8.1.1.).

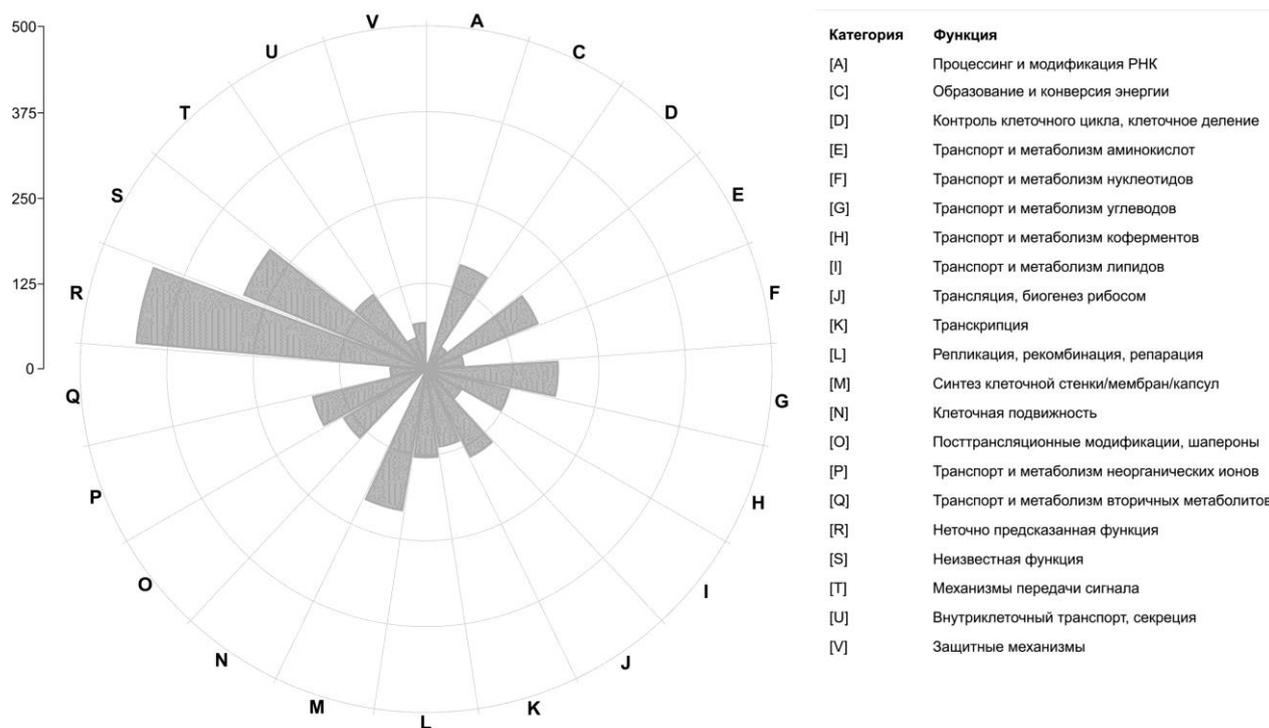


Рисунок 16. Распределение белок-кодирующих генов по функциональным COG-категориям (гены, принадлежащие к нескольким категориям, не были учтены при построении диаграммы).

8.1.3. Сравнение ключевых характеристик штамма GM2012 с другими родами семейства *Isosphaeraceae*

Помимо обособленного от других представителей *Isosphaeraceae* положения на филогенетическом дереве планктомицетов штамм GM2012 отличался от них и фенотипически. Так, от своего ближайшего родственника - *I. pallida* ATCC 43644 - штамм GM2012 отличался типом агрегации клеток (бесформенные агрегаты у штамма GM2012 вместо цепей), устойчивостью к NaCl и спектром используемых субстратов (Таблица 10). В то же время от изолятов из северных болот (роды *Singulisphaera*, *Paludisphaera* и *Tundrisphaera*) он отличался более высокой температурой роста, более высоким оптимальным значением pH и меньшей чувствительностью к NaCl. В сравнении с пресноводным изолятом *Aquisphaera giovannonii* штамм GM2012 имел более высокую оптимальную температуру роста и отличный спектр используемых субстратов.

Таблица 10. Фенотипические особенности типовых видов каждого рода в семействе *Isosphaeraceae*

Свойство	1	2	3	4	5	6
температура (min/opt/max)	37/42/46	34/41/51	4/20-26/33	10/30-35/35	6/15-25/30	4/15-22/28
pH (min/opt/max)	5.5/7.5-7.7/9.0	нд/7.8-8.8/нд	4.2/5.0-6.2/7.5	6.5/7.5-8.5/9.5	3.5/5.0-5.5/6.5	4.5/5.5-6.0/6.8
NaCl (min/opt/max)	0/0/3%	нд	0/0/0.5%	0/0/0.25%	0/0/0.5%	0/0/0.1%
жирные кислоты	C18:1 ω 9c, C18:0 и C16:0	нд	C18:1 ω 9c, C16:0 и C18:2 ω 6c,12c	C18:1 ω 9c и C16:0	C18:1 ω 9c, C18:0 и C16:0	C18:1 ω 9c, C16:0 и C14:0
мол. % G+C	70.1	66.2	59.9	70	66	61.2-62.2
ксилоза	+	нд	+	-	+	+
фруктоза	-	-	+	+	+	+
сахароза	-	нд	+	+	+	+
трегалоза	+	нд	+	+	+	+
раффиноза	-	нд	-	-	+	-
целлобиоза	-	нд	+	+	+	+
крахмал	+	нд	-	+	-	+
пектин	-	нд	+	нд	+	-
ксилан	-	нд	+	-	+	+
КМЦ	-	нд	нд	нд	нд	нд
ксантановая камедь	+	нд	нд	нд	нд	+

*1 – штамм GM2012, 2 – *Isosphaera* (Giovannoni et al., 1987), 3 – *Singulisphaera* (Kulichevskaya et al., 2008), 4 – *Aquisphaera* (Bondoso et al., 2011), 5 – *Paludisphaera* (Kulichevskaya et al., 2016; Ivanova et al., 2017), 6 – *Tundrisphaera* (Kulichevskaya et al., 2017b).

Основываясь на филогенетическом анализе, геномном сравнении и фенотипических свойствах (условия роста и спектр утилизируемых субстратов) мы считаем, что штамм GM2012, выделенный из пробы термальной воды шахты ТауТона, представляет новый род и вид в семействе *Isosphaeraceae*, которому было дано название *Tautonia sociabilis*.

Описание *Tautonia gen. nov.*

Грамотрицательные неподвижные клетки коккоидной формы встречаются в виде одиночных клеток или бесформенных скоплений. Размножаются почкованием. Облигатный аэроб. Термотолерантный. Нейтрофильный. Органотроф, растущий на моно-, ди- и полисахаридах. Катализ- и оксидаз-отрицательный. Основные жирные кислоты – C16:0, C18:1 ω 9 в C18:0.

Представитель филума *Planctomycetes* (порядок *Isosphaerales*, семейство *Isosphaeraceae*).
Типовым видом является *Tautonia sociabilis*.

Описание *Tautonia sociabilis* sp.nov.

Клетки 1.7–2.9 μm в диаметре. Диапазон температур для роста составлял 37–46 °С с оптимумом 42 °С. Диапазон значений pH для роста составлял 5.5–9.0 с оптимумом 7.5–7.7. Дрожжевой экстракт не требовался для роста. Растет в аэробных условиях с ксилозой, глюкозой, маннозой, галактозой, мальтозой, лактозой, трегалозой, декстрином, крахмалом, или ксантаном в качестве единственного источника углерода и энергии. Не растет на арабинозе, фруктозе, целлобиозе, сахарозе, раффинозе, декстранине, ксилане, пектине, агарозе, различных типах целлюлозы. Устойчив к пенициллину, ампициллину, амоксициллину и стрептомицину, чувствителен к канамицину, полимиксину, ванкомицину и хлорамфениколу. G+C состав генома составлял 70.1 %. Типовой штамм, GM2012 (=VKM В-2860,=KCTC 72013), был выделен из золотодобывающей шахты ТауТона (ЮАР). Номер генома в базе данных NCBI GenBank – RYZH000000000.

8.2. Описание штамма 2918 – представителя нового рода и вида *Thermogemmata fonticola*

8.2.1. Фенотипическая характеристика штамма 2918

Клетки штамма 2918 представляют собой кокки, 1-2 мкм в диаметре, встречающиеся в виде одиночных клеток, пар или небольших скоплений клеток (рис. 17А). Клетки размножаются почкованием (рис. 17Б). Ультраструктура клеток близка к грамотрицательным бактериям, так как отсутствует толстый слой пептидогликана и четкие внутриклеточные мембранные компартменты (рис. 17В).

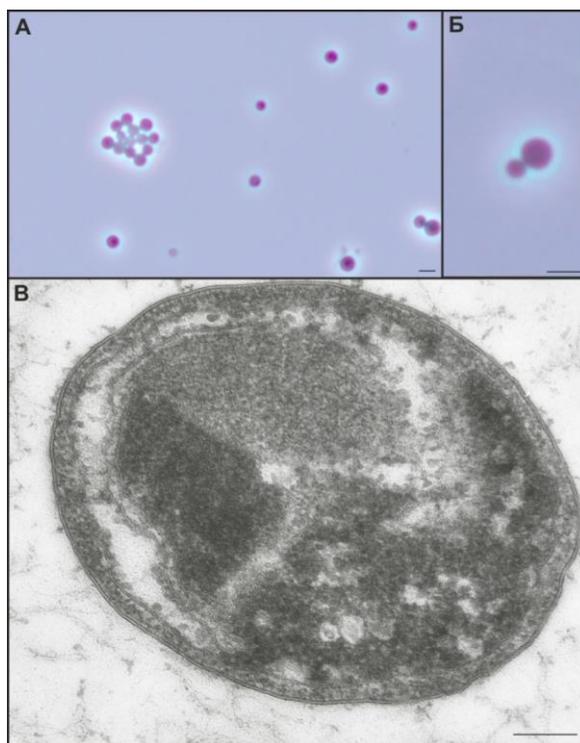


Рисунок 17. Морфология клеток штамма 2918: А – общий вид клеток под световым микроскопом (масштаб 2 мкм), Б – почкующиеся клетки под световым микроскопом (масштаб 2 мкм), В – ультратонкий срез клеток (масштаб 0.1 мкм).

Штамм 2918 рос в диапазоне температур от 25 °С до 60 °С и значениях pH от 5.0-8.0. Роста не наблюдалось при температуре 14 °С и ниже, а также при 65 °С и выше. Рост отсутствовал при значениях pH 4.5 и ниже, а также 8.5 и выше. Оптимальными условиями были 54-60 °С и pH 7.5. Изолят выдерживал до 0.5% NaCl (m/V), однако NaCl не был необходим для роста (оптимальная концентрация NaCl - 0%). Как видно из приведенных результатов, штамм является нейтрофилом и умеренным термофилом.

Штамм 2918 являлся органогетеротрофом, и в аэробных условиях использовал широкий спектр углеводов, в том числе полисахаридов, в качестве единственных источников углерода и энергии: глюкоза, ксилоза, манноза, мальтоза, сахароза, лактоза, целлобиоза, крахмал, лихенан, бета-глюкан, галактан, арабинан и ксантановая камедь. Штамм не был способен метаболизировать фруктозу, раффинозу, ксилан, пектин, КМЦ, ксилоглюкан, маннан, глюкоманнан и пуллулан. Кроме того, штамм 2918 не был способен сбраживать мальтозу или расти с мальтозой как источником углерода при анаэробном дыхании с элементарной серой (1 г л⁻¹), нитратом натрия (10 мМ) или тиосульфатом натрия (10 мМ) в качестве внешнего акцептора электронов.

Тесты на каталазу и оксидазу были отрицательными. Штамм был устойчив к воздействию ампициллина, стрептомицина, ванкомицину; но чувствителен к канамицину, полимиксину и новобиоцину.

8.2.2. Анализ филогенетического положения и геномный анализ штамма 2918

BLAST последовательности гена 16S рНК штамма 2918 показал, что штамм относится к семейству *Gemmataceae*: самый высокий процент сходства наблюдался между штаммом 2918 и *Gemmata obscuriglobus* DSM 5831^T (90.7%). Для определения точного положения изолята внутри семейства был проведен филогенетический анализ, основанный на сравнении последовательностей гена 16S рНК штамма 2918, всех чистых культур класса *Planctomycetia* и *Phycisphaera mikurensis* NBRC 102666^T в качестве внешней группы (рис. 18А). Был также проведен аналогичный анализ (рис. 18Б), но основанный на конкатенированных последовательностях 120 консервативных белков из набора *bac120* (Parks et al., 2017). Как анализ, основанный на сравнении генов 16S рНК, так и филогенетический анализ консервативных белков продемонстрировали, что штамм 2918 располагается на ветви, удаленной от других представителей семейства *Gemmataceae*, и, вероятно, представляет новый таксон уровня рода.

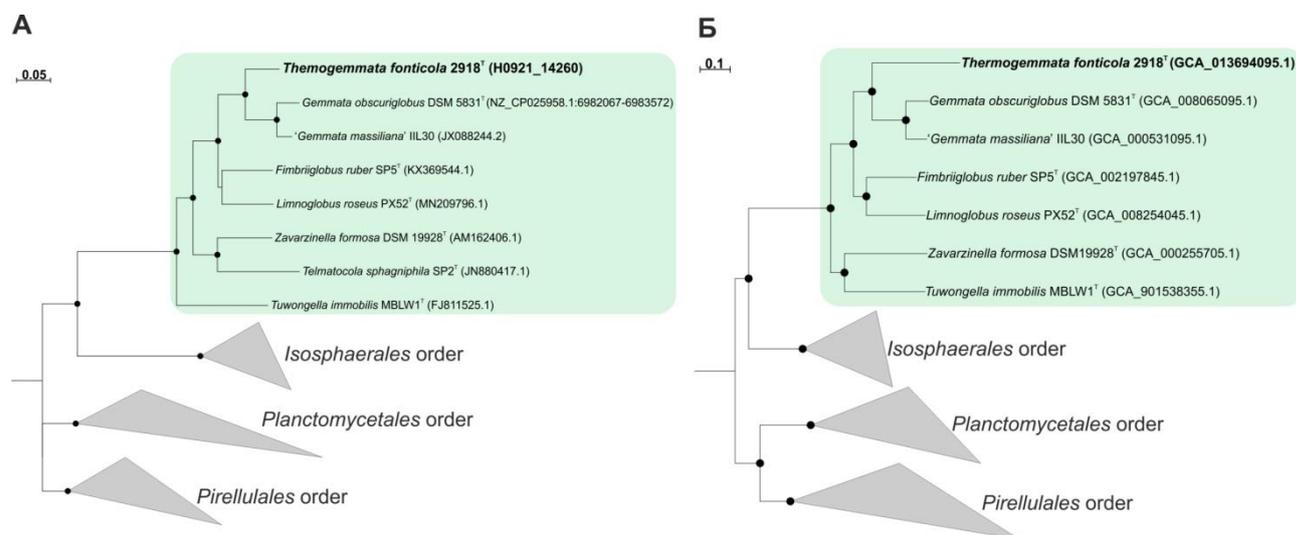


Рисунок 18. Филогенетические деревья, построенные с использованием метода Maximum-likelihood и показывающие положение штамма 2918 (выделен жирным шрифтом) внутри класса *Planctomycetia*. Дерево, основанное на сравнении генов 16S рНК (А): длина ветвей соответствует числу замен на позицию с поправками в соответствии с моделью (GTR, G + I, 4 categories); все позиции с покрытием менее 95% были исключены. Дерево, основанное на сравнении белков *bac120* (Б): длина ветвей соответствует числу замен на позицию с поправками в соответствии с моделью PROTGAMEILG. Числа в узлах отражают процентное значение bootstrap теста >50% (1000 повторений). Порядок *Gemmatales* обведен светло-зеленым прямоугольником. *Phycisphaera mikurensis* NBRC была использована в качестве внешней группы (не показана) для обоих деревьев.

Значения AAI между штаммом 2918 и другими представителями порядка *Gemmatales* составляли 50.4–58.3% (Таблица 11), что ниже значений, обычно наблюдающихся между

представителями одного рода (Luo et al., 2014). Парные значения ANI также были относительно низкими – 69.3–71.2% (Таблица 12).

Таблица 11. Парное сравнение значений AAI (в процентах) в геномах штамма 2918 и других представителей *Gemmatales*

	Tfon	Frub	Gobs	Lros	Timm	Zfor
<i>Thermogemmata fonticola</i> 2918		54.1	57.7	53.2	51.0	50.2
<i>Fimbrioglobus ruber</i> SP5	54.1		57.4	58.9	51.9	54.1
<i>Gemmata obscuriglobus</i> DSM 5831	57.7	57.4		56.7	51.3	52.5
<i>Limnoglobus roseus</i> PX52	53.2	58.9	56.7		51.4	53.1
<i>Tuwongella immobilis</i> MBLW1	51.0	51.9	51.3	51.4		51.8
<i>Zavarzinella formosa</i> DSM 19928	50.2	54.1	52.5	53.1	51.8	

Таблица 12. Парное сравнение значений ANI (в процентах) в геномах штамма 2918 и других представителей *Gemmatales*

	Tfon	Frub	Gobs	Lros	Tim m	Zfor
<i>Thermogemmata fonticola</i> 2918		70.5	71.0	70.4	69.7	69.5
<i>Fimbrioglobus ruber</i> SP5	70.4		73.0	73.6	70.0	71.7
<i>Gemmata obscuriglobus</i> DSM 5831	71.2	73.4		73.9	70.2	71.0
<i>Limnoglobus roseus</i> PX52	70.6	73.8	73.7		69.9	71.9
<i>Tuwongella immobilis</i> MBLW1	69.9	70.4	70.1	70.2		70.3
<i>Zavarzinella formosa</i> DSM 19928	69.3	71.6	70.7	71.8	70.1	

Общие характеристики геномов *Gemmatales* (размер и количество генов) сильно различались в зависимости от конкретного представителя порядка. Наибольший размер генома (12.3 млн п.о.) имел *Fimbrioglobus ruber*. Геномы *Gemmata obscuriglobus*, *Limnoglobus roseus* и *Zavarzinella formosa* имели размер 9-10 млн п.о., при этом геном штамма 2918 оказался наименьший (4.8 млн п.о.). Такая особенность может быть связана с термофильным образом жизни, который является энергетически затратным и часто приводит к потере части генов. Такая тенденция отмечается и для геномов других термофилов, размеры которых в целом меньше, чем геномы микроорганизмов (Zhaxybayeva et al., 2012).

Коровый геном представителей порядка *Gemmatales* состоял из 1142 генов (рис. 19). Количество уникальных белков у штамма 2918 составило 1412; среди других представителей *Gemmatales* количество таких белков варьировало от 3015 (*T. immobilis*) до 6836 (*F. ruber*).

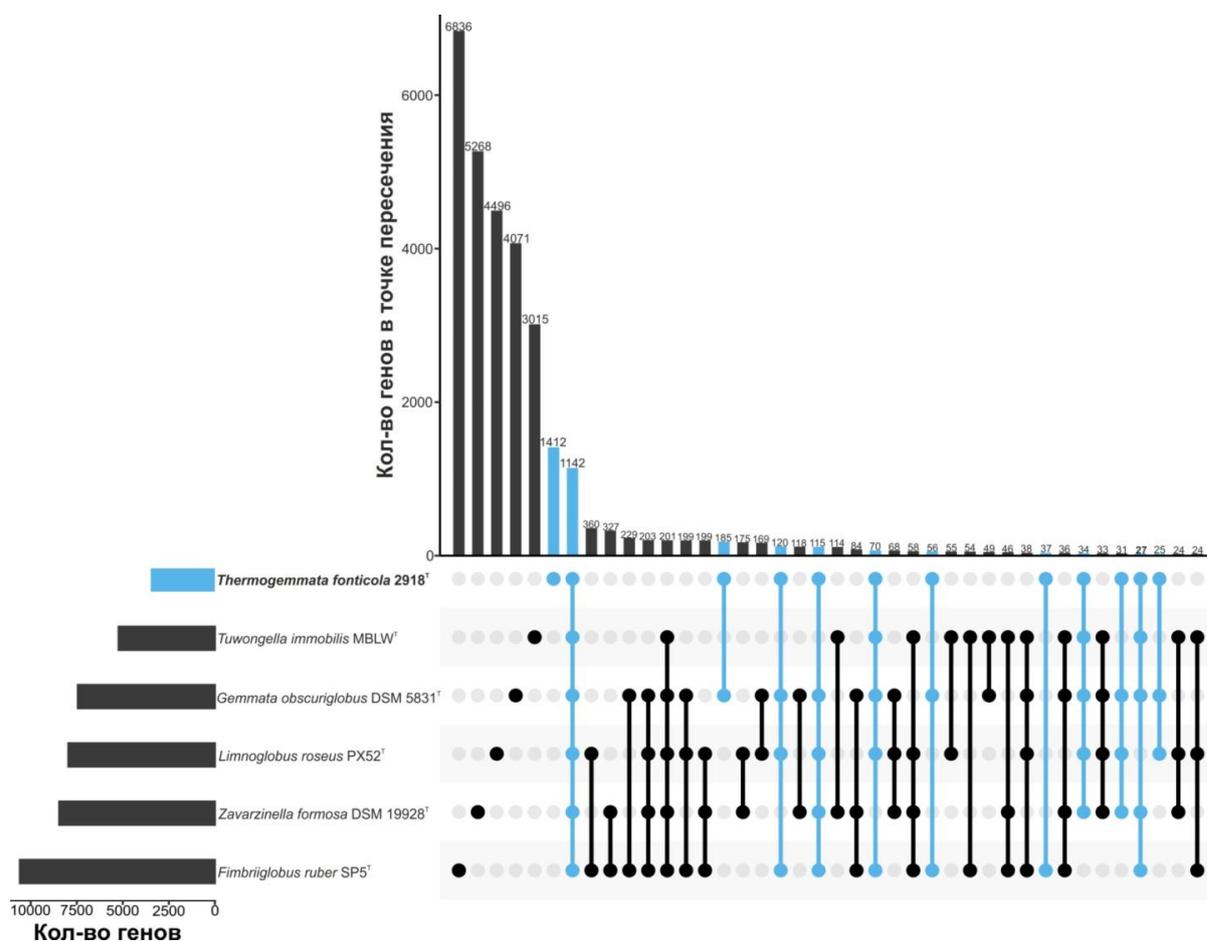


Рисунок 19. Коровый геном штамма 2918 и других представителей *Gemmatales*.

Распределение коровых и уникальных белков по функциональным категориям COG позволяет увидеть общую картину функциональных особенностей организмов (рис. 20). Сравнение распространенности COG категорий среди коровых и уникальных белков показало, что категории E (метаболизм аминокислот), F (метаболизм нуклеотидов), G (метаболизм углеводов), H (метаболизм кофакторов) и J (трансляция) были перепредставлены в коровой части генома в первую очередь из-за универсальных (независимых от места обитания) функций, которые необходимы для поддержания жизнедеятельности клеток. И, наоборот, среди уникальных белков было множество относящихся к категориям L (репликация и репарация), N (клеточная подвижность), T (сигналинг) а также R и S (неизвестные или плохо предсказываемые функции). Можно предположить, что эти белки отвечают за специфические адаптации к конкретной эконше.

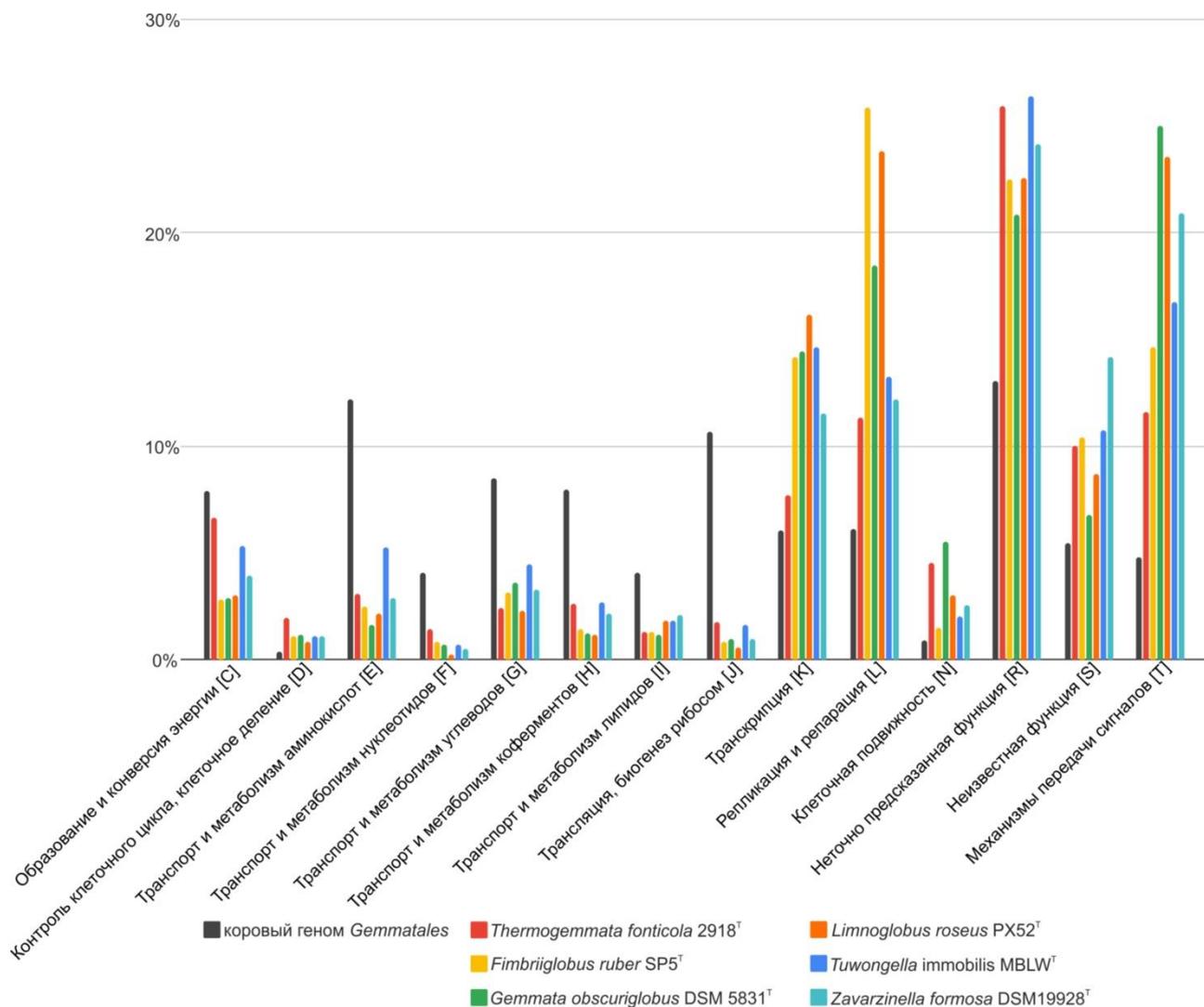


Рисунок 20. Распространение выбранных категорий COG среди коровых и уникальных белков *Gemmatales*. Коровая часть – черные столбцы, уникальные для каждого генома COGi собраны в цветные столбцы, где каждый цвет соответствует одному геному.

Известно, что большинство культивируемых представителей класса *Planctomycetia* (включая и порядок *Gemmatales*) могут разлагать полимеры (в основном полисахариды). Представители *Gemmatales* демонстрируют сильно различающиеся наборы ферментов, участвующих в разложении полисахаридов (Carbohydrate-Active EnZymes – CAZymes), что связано с различным спектром используемых субстратов и горизонтальным переносом генов – основным путем эволюции CAZymes (Heheman et al., 2010). При этом количество генов CAZymes было пропорционально размеру геномов исследуемых планктомицетов (рис. 21): штамм 2918 (размер генома 4.8 млн п.о.) имел наименьший набор из 111 генов, в то время как *F. ruber* (12.36 млн п.о.) располагал наибольшим количеством CAZymes (252). Во всех геномах более половины CAZymes относились к гликозил-трансферазам (GT), карбогидрат-эстеразам

(CE) и углевод-связывающим модулям (CBM) без известных каталитических доменов, которые не участвуют или частично участвуют во внеклеточном разложении полисахаридов.

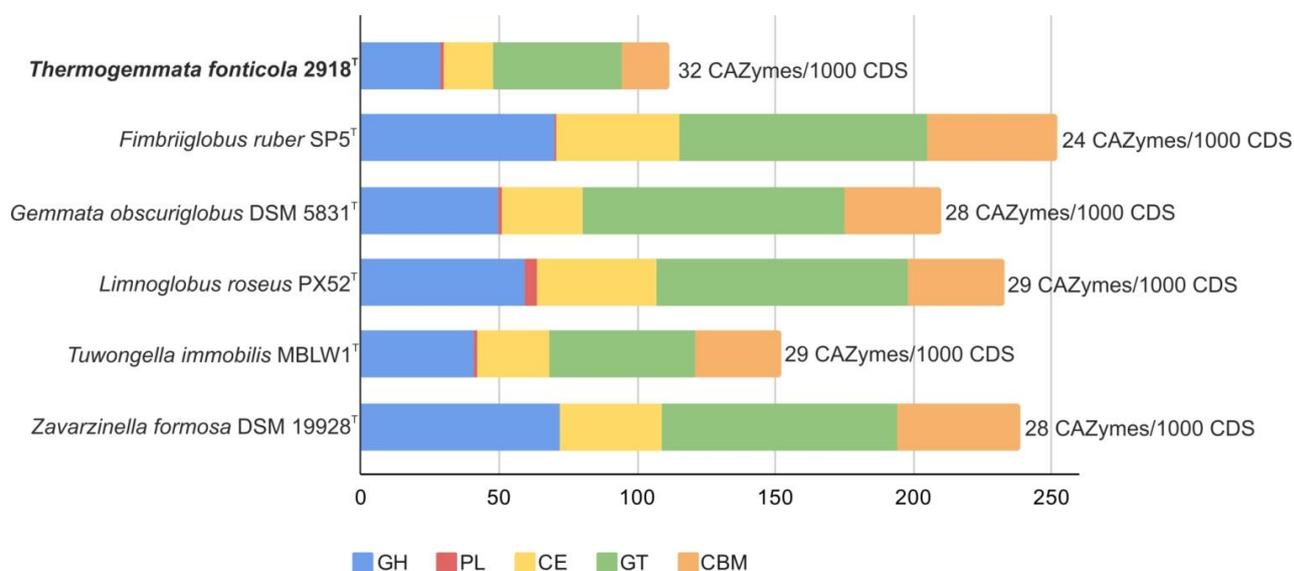


Рисунок 21. Состав наборов генов CAZymes, обнаруженных в геномах *Gemmatales*: GH – гликозидазы, PL – полисахаридлиазы, CE – углеводэстеразы, GT – гликозил-трансферазы, CBM – углевод-связывающие модули.

Штамм 2918 способен использовать широкий спектр полисахаридов (см. 3.2.2.3.). Крахмал может быть гидролизован рядом ферментов из семейств GH13 (MBA2227435.1, MBA2227610.1, MBA2226870.1), GH77 (MBA2225759.1) и GT35(MBA2225125.1, MBA2225136.1) (рис. 22). Ксантановая камедь, вероятно, метаболизируется по пути, сходному с *Thermogutta terrifontis* (см. ГЛАВА 9), под действием белков, содержащих домен с неизвестной функцией DUF1080, гликозидаз из GH2 (MBA2225013.1) и GH5 (MBA2227344.1). Дальние гомологи гликозидаз GH33 (MBA2225360.1, MBA2226641.1) могут отвечать за деградацию арабинана, так как GH33 является родственным семейству GH93 (экзо-альфа-арабиназы), оба относятся к клану GH-E. Ферменты, отвечающие за гидролиз галактана, лихенана и бета-глюкана не были обнаружены, однако в геноме закодированы предполагаемые гликозидазы, которые, возможно, могут проявлять галактаназную и бета-глюканазную активности: MBA2224662.1, MBA2227215.1, MBA2225363.1, MBA2225677.1, MBA2225809.1. Функционально-геномный анализ гликозидаз (GH) и полисахаридлиаз (PL), найденных в геномах других *Gemmatales* показал, что гены ферментов, участвующих в гидролизе альфа-глюканов (крахмал, декстрин, трегалоза), а именно семейств GH13, GH15, GH37, GH57, GH77 и GH133 находились во всех исследованных геномах. Другая общая тенденция – большое количество гликозидаз и полисахаридлиаз (GH2, GH5, GH23, GH33, GH43, GH51, GH55, GH63, GH64, GH99, GH141, GH144, PL29) с плохо предсказываемыми

активностями – более половины от общего количества. Сложность предсказания функции с помощью филогенетического анализа заключается в том, что эти белки формируют кластеры, располагающиеся отдельно от всех биохимически охарактеризованных ферментов из соответствующих семейств. Как и в геномах других планктомицетов, в геномах *Gemmatales* были обнаружены 14–27 генов, кодирующих белки DUF1080. Домен DUF1080, структурно сходный с семейством GH16, перепредставлен среди представителей суперфилума PVC. В геномах *Fimbriiglobus ruber* SP5 и *Zavarzinella formosa* DSM 19828 закодировано большое количество ферментов, возможно, участвующих в разложении хитина – GH18 и GH24; хитиноподобная активность *F. ruber* была подтверждена биохимически (Ravin et al., 2018). *Limnoglobus roseus* PX52 показывал пектинолитический потенциал благодаря большому набору пектазиаз и рамногалатуранлиаз из семейств PL1, PL10 и PL11. В геноме *Zavarzinella formosa* DSM19828 было обнаружено множество генов ферментов, активных против глюканов, содержащих бета-1,4-связи (семейства GH5, GH6, GH12 и GH44) и ксилана (семейства GH10, GH30 и GH39).

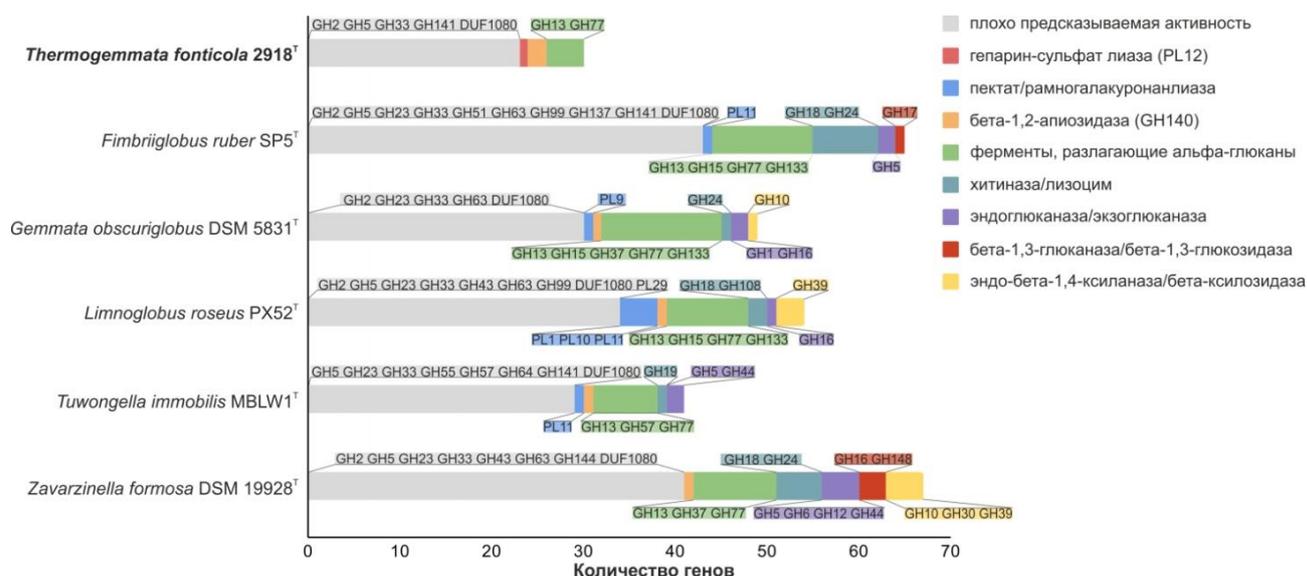


Рисунок 22. Предполагаемые активности GH и PL представителей *Gemmatales*: представители различных семейств соотносятся с наиболее вероятными активностями согласно легенде.

8.2.3. Сравнение ключевых характеристик штамма 2918 с другими родами семейства *Gemmataceae*

Штамм 2918 достаточно сильно отличается от своих ближайших родственников по фенотипическим характеристикам. В отличие от двух пресноводных родов (*Gemmata* и *Tuwongella*) штамм 2918 имеет гораздо более высокую температуру роста и другой набор используемых субстратов (Таблица 13). С другой стороны, представители *Gemmataceae*,

выделенные из северных сфагновых болот (*Zavarzinella*, *Telmatocola*, *Fimbrioglobus* и *Frigoriglobus*), являются более ацидофильными, имеют более низкую температуру роста, разлагают немного другой спектр полисахаридов.

На основании филогенетического анализа и сравнения фенотипических характеристик (диапазоны температуры и pH, используемые субстраты), мы предполагаем, что штамм 2918, который был выделен из горячего источника около реки Карымша (Камчатка), является представителем нового рода внутри семейства *Gemmataceae*. Для данного организма предложено имя *Thermogemmata fonticola*.

Описание *Thermogemmata gen. nov.*

Грамотрицательные клетки сферической формы размножаются почкованием. Строгий аэроб. Умеренно термофильный. Нейтрофильный. Обладает хемоорганотрофным метаболизмом. Основные жирные кислоты C18:0 and C20:0. Главный хинон МК6. Представитель филума *Planctomycetes* (порядок *Gemmatales*, семейство *Gemmataceae*). Типовым видом является *Thermogemmata fonticola*.

Описание *Thermogemmata fonticola sp.nov.*

Подвижные клетки 1–2 μm в диаметре. Клетки встречаются в виде одиночных клеток, пар и скоплений. Диапазон температур для роста составлял 25–60 °C с оптимумом 54–60 °C. Диапазон значений pH для роста составлял 5.0–8.0 с оптимумом 7.5. Дрожжевой экстракт не требовался для роста. Растет с ксилозой, глюкозой, маннозой, мальтозой, лактозой, сахарозой, целлобиозой, трегалозой, крахмалом, лихенаном, галактаном, арабинаном, ксантаном или бета-глюканом. Устойчив к ампициллину, стрептомицину и ванкомицину, чувствителен к канамицину, полимиксину и новобиоцину. Типовой штамм, 2918^T (=VKM В-3161 = КСТС 72012), был выделен из горячего источника около реки Карымша, Камчатка (Россия). Номер генома в базе данных NCBI GenBank – JACEFB000000000.

Таблица 13. Фенотипы типовых видов каждого рода в семействе *Gemmataceae*.

Характеристика	1	2	3	4	5	6	7	8
Морфология	сферические, 1–2 μm	от сферических до овальных, 1.4–3.0 μm,	сферические, 1.5–2.3 μm	сферические, 1.6–2.8×1.4–2.8 μm	сферические, 1.2–2 μm	эллипсоидные, 2.5–3.2×2.0–2.5 μm	сферические, 2.2–3.1 μm	сферические, 1.8–2.6 μm
Подвижность	+	+	+	-	-	+	-	+
Формирование розеток	-	-	+	-	+	+	-	-
Stalk formation	-	-	+	-	+	+	-	-
Температура	25/54-60/60	16/nd/35	10/20-25/30	10/20-25/30	6/20-26/30	10/20-25/30	20/32-36/40	4/15-22/28
pH	5.0/7.5/8.0	7.8/nd/8.8	5.0/6.5/7.5	4.0/5.5-6.0/6.8	4.0/5.0-5.5/7.0	3.8/5.5-6.0/7.2	6.0/7.5-8.0/10.5	4.2/5.0-5.5/6.8
Соленость	0/0/0.5	0/0/0.6	0/0/0.5	0/0/0.1	0/0/<0.1	0/0/0.6	0/0/0.4	0/0/0.5
Сахароза	+	+	+	+	+	+	-	+
Ксилоза	+	+	+	+	+	+	-	+
Лактоза	+	+	+	+	-	+	nd	+
Манноза	+	+	+	+	+	-	nd	+
Раффиноза	-	-	+	+	+	+	nd	-
Ксилан	-	+	w+	+	+	+	nd	+
Пектин	-	+	w+	-	-	+	nd	-
КМЦ	-	-	-	-	+	-	nd	+
Ксантановая камедь	+	nd	+	+	nd	nd	nd	+
Крахмал	+	+	+	+	+	+	nd	+
G+C, %	60.4	64-67.2	65.6	60.7	58.5	62.5	57	67.4
Основные жирные кислоты	C _{18:0} ; C _{20:0}	C _{18:0} ; C _{16:1ω5c}	C _{18:1ω7} ; C _{18:0}	C _{20:1ω9} ; C _{16:0}	C _{16:1ω5} ; C _{18:1ω5}	C _{18:1ω5} ; C _{16:1ω5}	C _{16:1ω5} ; C _{16:0}	C _{18:0} ; βOH-C _{16:1} ; C _{16:1ω5c}
Хиноны	МК-6	nd	МК-6	МК-6	nd	МК-6	nd	nd
Размер генома	4.81	9.0	9.38	12.36	nd	10.09	6.69	9.83

*1 – штамм 2918; 2 – *Gemmata obscuriglobus* (Franzmann and Skerman, 1984; Kulichevskaya et al., 2009); 3 – *Limnoglobus roseus* (Kulichevskaya et al., 2020b); 4 - *Fimbriiglobus ruber* (Kulichevskaya et al., 2017a); 5 - *Telmatocola sphagniphila* (Kulichevskaya et al., 2012b); 6 - *Zavarzinella formosa* (Kulichevskaya et al., 2009); 7 - *Tuwongella immobilis* (Seeger et al., 2017); 8 - *Frigoriglobus tundricola* (Kulichevskaya et al., 2020b)

ГЛАВА 9. *IN SILICO* РЕКОНСТРУКЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА УГЛЕВОДОВ ТЕРМОФИЛЬНОГО ПЛАНКТОМИЦЕТА *THERMOGUTTA TERRIFONTIS* R1 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНОМИКИ И ТРАНСКРИПТОМИКИ

Thermogutta terrifontis R1 является одним из первых описанных термофильных представителей филума *Planctomycetes* (Slobodkina et al. 2015). Типовой штамм был выделен из наземного горячего источника о. Кунашир (Курильские о-ва, РФ). Как и другие культивируемые планктомицеты, этот штамм мог расти на различных олиго- и полисахаридах. Вместе с тем, штамм R1 был способен к брожению и анаэробному дыханию – принципиально новым свойствам для представителей данного филума. Однако механизмы, определяющие эти особенности, были неизвестны. Среди разлагаемых *T. terrifontis* R1 субстратов была ксантановая камедь – гетерополисахарид, синтезируемый *Xanthomonas campestris* и состоящий из основной бета-1,4-глюкановой цепи и боковых групп, состоящих из маннозил-глюкуронил-маннозы. На данный момент о путях разложения ксантановой камеди известно не очень много. В литературе описан ряд ферментов, необходимых для разложения боковой цепи (ксантан-лиаза, бета-глюкуронидаза и альфа-маннозидаза), однако не охарактеризовано ни одной гликозидазы, расщепляющей основную цепь ксантановой камеди. Поскольку, забегая вперед можно сказать, что сравнительно-геномный анализ не выявил гомологов вышеперечисленных ксантанлиазы у *T. terrifontis* R1, а предсказать в такой ситуации фермент, гидролизующий основную цепь вообще не представляется возможным, мы провели работу по исследованию центрального метаболизма углеводов *T. terrifontis* R1, уделяя особое внимание путям разложения ксантановой камеди с использованием как сравнительной геномики, так и дифференциальной (исследование транскриптомов клеток, выращенных в разных условиях) транскриптомики.

9.1. Секвенирование и общие характеристики генома *Thermogutta terrifontis* R1

Совместно с коллегами из Университета Копенгагена и Института биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН был секвенирован полный геном *T. terrifontis* (рис. 23). Геном был собран в кольцевую хромосому, имел размер 4810751 п.о., мол. % G+C составлял 57.34%. Всего в геноме было обнаружено 4504 белок-кодирующих генов, из которых 2412 генов имели неизвестную функцию и их продукты обозначены как «гипотетические белки». Были идентифицированы 3 гена рРНК и 46 генов тРНК.

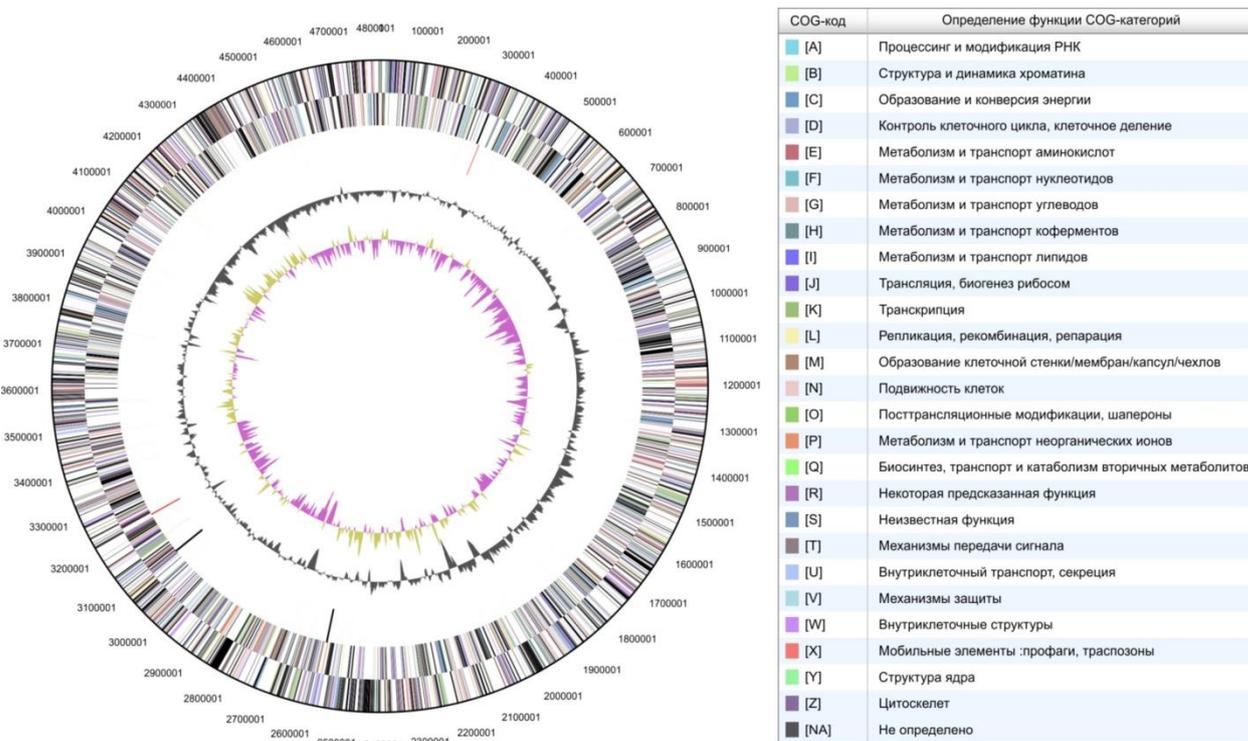


Рисунок 23. Карта хромосомы *T. terrifontis* R1. От внешней стороны к центру кольца расположены: гены на прямой цепи ДНК (окрашены в соответствии с COG-категориями), гены на обратной цепи ДНК (окрашены в соответствии с COG-категориями), рРНК (тРНК – зеленые линии, рРНК – красные, другие РНК – черные), содержание Г+Ц, смещение Г+Ц.

9.2. Секвенирование транскриптома и его общие характеристики

Клетки *T. terrifontis* R1 были выращены на среде с добавлением ксантана и трегалозы (каждый вариант в трех повторностях). Была выделена тотальная РНК и с помощью обратной транскриптазы получена кДНК. При секвенировании кДНК с использованием Illumina было получено от 11.5 млн. пар прочтений до 12.1 млн пар прочтений в разных повторностях; 91.3-98.5% этих прочтений уникально картировались на геномную последовательность. Анализ дифференциальной (при разных условиях культивирования – на ксантановой камеди и трегалозе) экспрессии генов показал, что 665 генов имели повышенную экспрессию, а 617 генов – пониженную экспрессию в клетках, выращенных на ксантановой камеди, по сравнению с клетками, выращенными на трегалозе, согласно edgeRun тесту с использованием P-value (< 0.05) с поправкой Бенджамини-Хохберга (рис. 24).

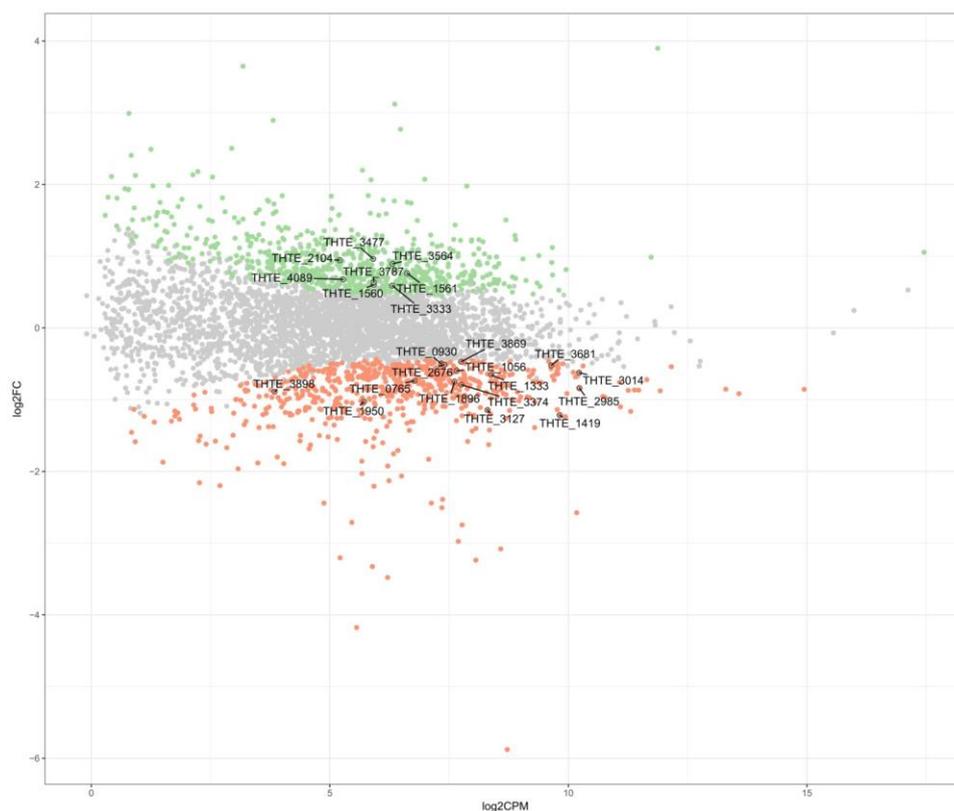


Рисунок 24. Дифференциальная экспрессия генов между клетками, выращенными на ксантане или трегалозе: зеленые и красные точки отображают гены с повышенной и пониженной экспрессией в клетках, выросших на ксантановой камеди (FDR < 0.05), серые точки – гены, без значимой регуляции; Указаны номера генов, которые согласно сравнительно-геномному анализу были охарактеризованы как отвечающие за разложение ксантановой камеди и трегалозы, а также за центральный углеводный метаболизм. FC (fold change) – отношение уровня экспрессии генов между двумя типами образцов, CPM (count per million) – количество полученных при секвенировании прочтений данного гена на миллион всех картированных прочтений.

9.3. Реконструкция путей деградации олиго- и полисахаридов с использованием геномики

Ранее было показано, что *T. terrifontis* R1 может использовать для роста следующие олиго- и полисахариды: сахароза, трегалоза, целлобиоза, крахмал, ксилан, пектин и ксантановая камедь. При этом добавление мальтозы, лактозы, агарозы, альгината, целлюлозы, хитина или инулина не стимулировало рост данного штамма (Slobodkina et al., 2015).

Проведенный нами анализ показал, что геном *T. terrifontis* R1 содержит 101 ген (Таблица 14), кодирующий гликозидазы (GH), 14 генов, кодирующих полисахаридлиазы (PL) и 3 гена, кодирующих карбогидратэстеразы (CE). Из них для 54 белков была предсказана внеклеточная локализация (закрепление на поверхности клеток или секреция во внешнюю

среду). Среди CAZymes не было обнаружено доминирования какого-либо из семейств (Lombard et al., 2014), однако наиболее многочисленными были семейство GH5 (10 белков) и предполагаемые гликозидазы, содержащие домен DUF1080 (9 белков).

Таблица 14. Гены *T. terrifontis* R1, кодирующие гликозидазы, полисахаридлиазы и карбогидратэстеразы

Ген, <i>TNTE_</i>	Функция	Домены CAZy	SignalP	SecretomeP	TMHMM
208	бета-галактозидаза / бета-глюкуронидаза / новая активность GH2	GH2+CBM67	-	-	0
0396	предполагаемая GH	-	-	+	0
0436	полигалактуроназа	GH28	+	-	0
0474	предполагаемая GH	CBM66	-	-	1
0494	альфа-L-фукозидаза	GH29	+	-	0
0655	предполагаемая GH	CBM4+GH51	-	-	0
0688	бета-ксилозидаза	GH39	-	-	0
0696	бета-фруктозидаза	CBM38+GH32	-	-	0
0808	предполагаемая PL	PL12	-	-	0
0842	предполагаемая GH	-	-	-	0
0861	предполагаемая PL	-	-	-	0
0880	предполагаемая GH	-	+	+	1
0890	эндоглюканаза	GH5	-	-	0
0913	альфа-L-рамнозидаза	GH106	-	-	0
0963	гликозидаза GH116	CBM38+GH116	-	-	0
1038	предполагаемая GH	CBM66	+	+	0
1077	предполагаемая PL	-	-	-	1
1080	альфа-L-рамнозидаза	CBM32+GH106	-	-	0
1086	бета-L-арабинозидаза	GH127	-	-	0
1171	гликозидаза GH5	GH5	+	-	0
1180	предполагаемая GH	CBM51	-	-	1
1217	арабиназа/сиалидаза	GH33+GH93	-	-	0
1226	альфа-L-рамнозидаза	GH106	+	-	0
1288	предполагаемая PL	PL15	-	-	1
1430	альфа-L-рамнозидаза	GH106+CBM67	-	-	0
1440	альгинатлиаза	PL15	-	+	0
1454	предполагаемая GH	-	-	-	0
1477	изоамилаза	GH13	-	-	0
1485	бета-L-арабинозидаза	GH127	-	-	0
1488	рамногалактуронан- лиаза	PL11	-	-	0

Продолжение Таблицы 14.

Ген, <i>THTE_</i>	Функция	Домены CAZy	SignalP	SecretomeP	TMHMM
1516	полигалактуроназа	GH28	-	-	0
1560	альфа-галактозидаза	GH36+GH36	+	-	0
1561	предполагаемая GH	CBM66	-	-	1
1595	эндо-1,2-альфа-маннозидаза	GH99	-	-	0
1596	гликозидаза GH5	GH5+CBM4	-	-	1
1652	гликозидаза GH36	GH36	+	-	0
1668	альфа-L-арабинозидаза	CBM66+GH51	-	-	1
1726	ацетилксиланэстераза	CE10	+	-	1
1734	гликозидаза GH5	GH5	-	-	0
1774	гликозидаза GH33	GH33	-	-	1
1776	бета-гексозоаминидаза	GH20	-	-	0
1802	предполагаемая GH	CBM51	-	-	0
1819	гликозидаза GH39	CBM4+CBM16+ GH39	-	-	1
1884	бета-ксилозидаза	GH39	-	-	1
1929	предполагаемая GH	CBM16+GH20	-	-	0
1966	предполагаемая PL	CBM35	-	+	1
1993	пектатлиаза	PL10	-	-	0
2055	сиалидаза	GH33	-	+	0
2056	предполагаемая PL	PL6	-	-	1
2101	альфа-L-рамнозидаза	CBM67+CBM67 +GH78	+	-	0
2104	бета-галактозидаза / бета-глюкуронидаза / новая активность GH2	GH2	+	-	0
2108	гликозидаза GH39	GH39	+	-	0
2109	альфа-галактозидаза (GH27)	CBM51	-	-	1
2121	полигалактуроназа	GH28	-	-	0
2124	бета-L-арабинозидаза	GH127	-	-	0
2126	гликозидаза GH5	GH5	-	-	1
2137	эндо-бета-1,4-маннозидаза	GH26+CBM32	-	-	0
2143	4-альфа-глюканотрансфераза	GH77	-	-	0
2173	предполагаемая GH	GH99+CBM40	-	-	1
2177	бета-L-арабинозидаза	GH127	-	-	0
2188	глюкуронил-гидролаза	GH88	-	-	0
2189	альфа-L-арабинозидаза	GH51	+	-	1

Продолжение Таблицы 14.

Ген, <i>TNTE_</i>	Функция	Домены CAZy	SignalP	SecretomeP	TMHMM
2199	предполагаемая GH	GH5	+	-	0
2234	предполагаемая GH	GH33	-	+	0
2342	гепарин-сульфатлиаза	PL12	-	-	0
2388	гликозидаза GH42	CBM4+GH42	-	-	0
2391	предполагаемая GH	GH28	+	-	0
2393	предполагаемая GH	GH42	+	-	0
2406	альгинатлиаза	PL12	-	-	1
2430	бета-глюкозидаза	GH116	-	-	0
2480	предполагаемая CE/GH	CE3+CBM66	-	-	1
2600	предполагаемая GH	GH10	-	-	0
2605	альфа-маннозидаза	GH38	-	-	0
2697	гликозидаза GH123	GH123	-	-	0
2787	предполагаемая GH	-	-	-	0
2789	сиалидаза	GH33	-	+	0
2820	бета-галактозидаза / бета-глюкуронидаза / новая активность GH2	GH2+CBM32	-	-	0
2824	ацетилксиланэстераза	CE7	-	-	0
2830	предполагаемая PL	-	-	+	0
2852	альфа-L-рамнозидаза	GH78	+	-	0
2853	предполагаемая GH	CBM66	+	-	0
2856	экзо-бета-агаразы	GH50	-	-	0
2930	предполагаемая GH	GH93	-	-	0
3078	бета-1,3-глюканаза	GH81	-	+	0
3153	1,4-альфа-глюкан- разветвляющий фермент	CBM48+CBM48 +GH13	-	-	0
3216	гликозидаза GH5	GH5	-	-	1
3262	альфа-агаразы	GH96	-	-	0
3305	альфа-L-арабинозидаза	GH62	-	-	0
3333	гликозидаза GH5	CBM35+GH5	+	-	0
3338	предполагаемая GH	CBM66	-	-	0
3372	гликозидаза GH5	GH5	-	-	0
3386	гликозидаза GH5	GH5	+	-	0
3432	бета-глюканаза	GH16	-	+	0
3433	бета-галактозидаза / бета-глюкуронидаза / новая активность GH2	GH2	-	-	0
3534	предполагаемая GH	-	-	+	1
3544	предполагаемая GH	-	-	-	0

Продолжение Таблицы 14.

Ген, ТНТЕ_	Функция	Домены CAZy	SignalP	SecretomeP	ТМНММ
3520	предполагаемая GH	GH38	-	-	0
3553	предполагаемая PL/GH	-	-	+	1
3584	предполагаемая GH	GH129	-	-	1
3601	рамногалактуронан- лиаза	PL11	-	+	0
3688	эндоглюканаза	GH5	-	-	0
3737	предполагаемая GH	-	-	-	0
3783	альфа-амилаза	GH57	-	-	0
3787	гликозидаза GH5	GH5	-	-	0
3824	бета-галактозидаза / бета-глюкуронидаза / новая активность GH2	GH2+CBM22+C BM4	-	-	1
3910	предполагаемая GH	GH43	-	-	0
3961	эндо-1,4-бета-ксиланаза	GH10	-	-	0
4088	предполагаемая GH	CBM9	-	-	0
4089	предполагаемая GH	-	+	-	0
4098	предполагаемая PL	-	-	-	0
4145	N-ацетил- галактозоаминидаза	GH129	-	-	1
4163	предполагаемая GH	-	+	-	0
4199	альфа-L-фукозидаза	GH29+CBM32	-	-	0
4222	предполагаемая GH	GH76	-	-	0
4234	предполагаемая GH	GH32	-	-	0
4327	гликозидаза GH99	GH99	-	-	0
4390	альфа-L-рамнозидаза	GH106+CBM67	-	-	1
4455	предполагаемая GH	-	-	+	0

Детальный анализ специфичности CAZymes показал наличие следующих активностей: трегалоза могла расщепляться под действием трегалозсинтазы (Qu et al., 2004), работающей в обратном направлении (ТНТЕ_2039). Гидролиз сахарозы осуществлялся внутриклеточной фруктозидазой (ТНТЕ_0696). Альфа-1,4- и альфа-1,6,-гликозидные связи в крахмале могли гидролизоваться за счет ряда гликозидаз из семейств GH13 и GH77 (ТНТЕ_1477, ТНТЕ_2143, ТНТЕ_3153 и ТНТЕ_3783) с образованием мальтоолигосахаридов и глюкозы. Целлобиоза могла расщепляться под действием бета-глюкозидазы (ТНТЕ_0963) или одной из предполагаемых гликозидаз с неизвестными функциями из GH2 и GH5. Ксилан мог разлагаться на ксилоолигосахариды за счет действия эндоксилаз (ТНТЕ_2600 и ТНТЕ_3961) и ксилозу – за счет бета-ксилозидаз (ТНТЕ_0688, ТНТЕ_1819, ТНТЕ_1884 и ТНТЕ_2108).

Разложение пектина происходило, скорее всего, под действием пектатлиазы (ТНТЕ_1993) и нескольких полигалактуроназ (ТНТЕ_0436, ТНТЕ_1516 и ТНТЕ_2121) с высвобождением D-галактуроновой кислоты и дальнейшим расщеплением до ФГА и пирувата (см. 3.3.4.). Как мы предполагаем, большое количество гликозидаз вовлечено в гидролиз ксантановой камеди (см. 3.3.6).

9.4. Реконструкция центрального метаболизма углеводов с использованием сравнительной геномики

Основные продукты гидролиза полисахаридов представлены глюкозой, фруктозой, маннозой, ксилозой, галактуроновой и глюкуроновой кислотами. Рост на некоторых из вышеперечисленных мономеров (глюкоза, манноза, ксилоза) был показан в статье по описанию штамма R1 (Slobodkina et al., 2015).

Метаболизм D-глюкозы и D-фруктозы происходит за счет гликолиза (рис. 26, 27; таблица 15). Примечательно, что в геноме содержатся гены как АТФ-зависимых фосфофруктокиназ (ТНТЕ_2190), так и РР_i-зависимых (ТНТЕ_0093, ТНТЕ_1056, ТНТЕ_2629). Предполагается, что РР_i-зависимые фосфофруктокиназы участвуют в глюконеогенезе и пентозо-фосфатном пути (см. ниже). Отсутствуют гены 6-фосфоглюконат-дегидратазы – ключевого фермента пути Энетнера-Дудорова, а также гены глюкозо-1-Ф-дегидрогеназы и глюконат-дегидратазы.

Ксилоза, как мы предполагаем, метаболизируется следующим образом: импортируемая извне ксилоза изомеризуется до ксилулозы под действием ксилозо-изомеразы (ТНТЕ_2111); далее ксилулокиназа (ТНТЕ_0598) фосфорилирует ксилулозу до ксилулозо-5-Ф, который поступает в пентозо-фосфатный путь (рис 26, 27; Таблица 15). Все гены, кодирующие ферменты окислительной и синтетической ветвей этого пути, за исключением гена трансальдолазы, были нами обнаружены в геноме штамма R1. Образующаяся в результате работы транскетолазы седогептулозо-7-Ф может быть фосфорилирована РР_i-зависимыми фосфофруктокиназами ТНТЕ_0093 и ТНТЕ_2629, ближайший охарактеризованный гомолог которых (UniProt Q609I3, Reshetnikov et al., 2008) имеет более высокое сродство к седогептулозо-7-Ф, чем к фруктозо-6-Ф. Далее седогептулозо-1,7-бисФ расщепляется до эритрозо-4-Ф и дигдроксиацетонфосфата за счет работы фруктозо-1,6-бисФ-альдолазы (ТНТЕ_1419), такая активность гомологичного фермента была описана ранее (Susskind et al., 1982; Schellenberg et al., 2014).

D-галактуронат, образующийся в ходе деградации пектина, в результате нескольких ферментативных реакций распадается на ФГА и пируват (рис. 25), все необходимые гены

которых кроме гена альтронат-оксидоредуктазы были найдены в геноме штамма R1. Известные альтронат-оксидоредуктазы относятся к семейству полиол-специфичных длинноцепочечных (long-chain) дегидрогеназ/редуктаз (Klimacek et al., 2003), генов которых обнаружено не было. Однако геном содержал несколько генов (*THTE_0865*, *THTE_1784*, *THTE_2229*, *THTE_2632*, *THTE_3060*, *THTE_3480* и *THTE_3564*), которые, возможно, кодируют ферменты из семейства короткоцепочечных (short-chain) дегидрогеназ/редуктаз (Jörnvall et al., 1995). Один из биохимически охарактеризованных представителей этого семейства, оксидоредуктаза UxaD из термофильной бактерии *Thermotoga maritima*, демонстрировала близкую маннонат-оксидоредуктазную активность (Rodionova et al., 2012), что дает нам основания полагать, что одна из короткоцепочечных дегидрогеназ/редуктаз может осуществлять реакцию восстановления тагатураната до альтроната

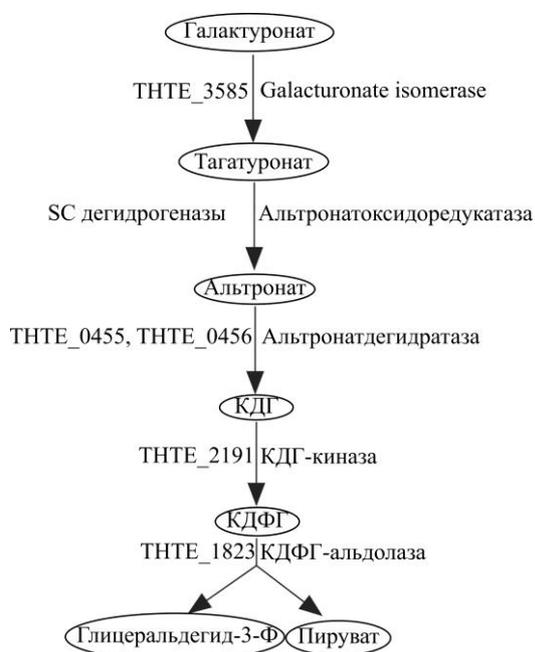


Рисунок 25. Катаболизм D-галактуроната у *T. terrifontis* R1.

Метаболизм продуктов гидролиза ксантановой камеди – глюкозы, глюкуроната и маннозы – будет рассмотрен в разделе 9.6.

Пируват, образующийся в ходе катаболизма моносахаридов и уоновых кислот, окислялся до ацетил-КоА под действием пируват-дегидрогеназного комплекса: пируват-дегидрогеназа (E1 – THTE_3014), дигидроксилипоамид-ацетилтрансфераза (E2 – THTE_2674) и липоамид-дегидрогеназа (E3 – THTE_2676).

Слободкиной и соавторами (2015) было показано, что продуктами сбраживания глюкозы являются водород, лактат и ацетат. Лактат может образовываться из пирувата за счет лактат-дегидрогеназы (THTE_3348). В то же время механизм образования ацетата не до конца

ясен, т.к. несмотря на то, что были обнаружены гены двух ацетат-киназ (*THTE_1319* и *THTE_2274*), генов ацетил-фосфотрансфераз не было найдено. Возможно, ацетат мог образовываться в результате работы КоА-ацилирующей альдегид-дегидрогеназы (*THTE_1321*, Toth et al., 1999) и другой альдегид-дегидрогеназы (*THTE_2212*), катализирующей окисление ацетальдегида с формированием ацетата и НАДН (Ho and Weiner, 2005). Также ацетат мог вырабатываться под действием предполагаемой АДФ-образующей ацетил-КоА синтетазы, как это происходит у гипертермофильных архей (Musfeldt and Schönheit, 2002).

Водород, образующийся при брожении, является результатом работы [NiFe]-гидрогеназы *THTE_4311-4313* и [FeFe]-гидрогеназ *THTE_2884*, *THTE_2882*, *THTE_2881*, *THTE_3842-THTE_3844*. Стоит отметить, что в большинстве планктомицетных геномов отсутствуют гены [FeFe]-гидрогеназ.

Все гены, кодирующие ферменты ЦТК, были обнаружены в геноме *T. terrifontis* R1. (рис 26, 27, Таблица 15).

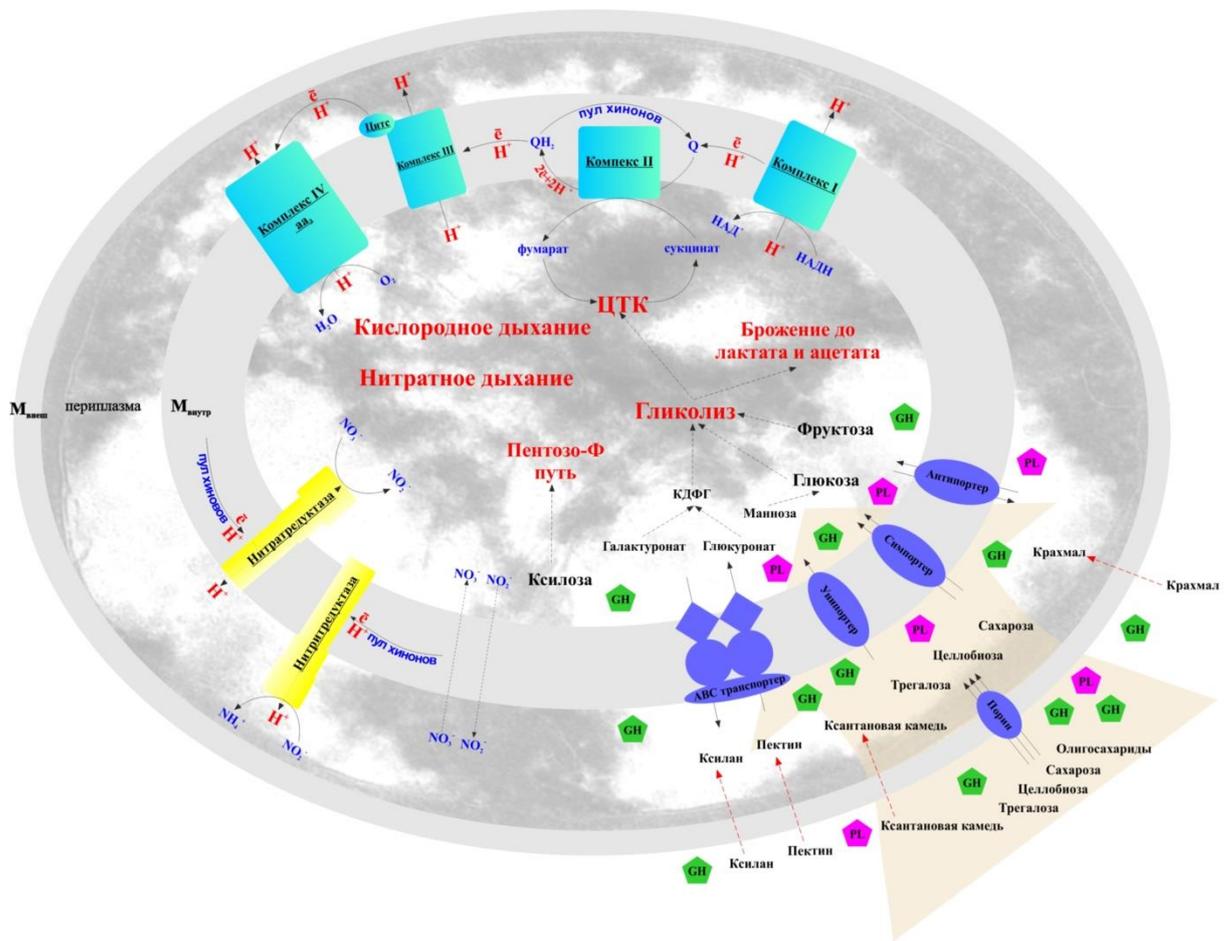


Рисунок 26. Реконструкция катаболизма углеводов, ЭТЦ, терминальных оксидоредуктаз: $M_{внеш}$ – внешняя мембрана; $M_{внутр}$ – внутренняя мембрана; КДФГ – 2-кето-3-дезоксифосфоглюконат; ЦТК – цикл трикарбоновых кислот; Цит с – цитохром с; GH – гликозидазы; PL – полисахаридиазы.

Таблица 15. Гены, кодирующие ферменты центрального метаболизма сахаров

Путь	Фермент	Ген
гликолиз	глюкокиназа	<i>THTE_0095, THTE_2175, THTE_3207, THTE_4164</i>
	глюкозо-6-Ф-изомераза	<i>THTE_1855</i>
	фосфофруктокиназа	<i>THTE_0093¹, THTE_1056¹, THTE_2190², THTE_2629¹</i>
	фруктозо-1,6-бис-Ф-альдолаза	<i>THTE_1419</i>
	глицеральдегид-3-Ф дегидрогеназа	<i>THTE_2985</i>
	фосфоглицераткиназа	<i>THTE_3374</i>
	фосфоглицератмутаза	<i>THTE_0470, THTE_1181</i>
	енолаза	<i>THTE_1986</i>
	пируваткиназа	<i>THTE_3477</i>
пентозо-фосфатный путь	глюкозо-6-Ф-дегидрогеназа	<i>THTE_1713</i>
	6-фосфоглюколактоназа	<i>THTE_4372</i>
	6-фосфоглюконат-дегидрогеназа	<i>THTE_2631</i>
	рибулозо-5-Ф-изомераза	<i>THTE_1333</i>
	рибулозо-5-Ф-эпимераза	<i>THTE_0930</i>
	транскетолаза	<i>THTE_0645</i>
	трансальдолаза	-
	PPi- фосфофруктокиназа (Седогептулозо-7-Ф фосфорилирующая)	<i>THTE_0093, THTE_2629</i>
фруктозо-1,6-бис-Ф-альдолаза	<i>THTE_1419</i>	
цикл трикарбоновых кислот	цитратсинтаза	<i>THTE_1896</i>
	аконитаза	<i>THTE_3127</i>
	изоцитрат-дегидрогеназа	<i>THTE_1950</i>
	Фд-зависимая 2-оксоглутарат-оксидоредуктаза	<i>THTE_0056 (alpha-subunit), THTE_0055 (beta-subunit)</i>
	сукцинил-КоА-лигаза	<i>THTE_3900 (alpha-subunit), THTE_3898 (beta-subunit)</i>
	сукцинатдегидрогеназа	<i>THTE_3868 (FeS-subunit), THTE_3869 (flavoprotein subunit)</i>
	фумаратгидратаза	<i>THTE_0765</i>
	малатдегидрогеназа	<i>THTE_1184</i>

¹ – пирофосфат (PP_i)-зависимая (ЕС 2.7.1.90).² – АТФ-зависимая (ЕС 2.7.1.11).

9.5. Реконструкция механизмов аэробного и анаэробного дыхания с использованием сравнительной геномики

Была обнаружена полная, действующая в аэробных условиях ЭТЦ, включающая НАДН-дегидрогеназный комплекс (I), сукцинат-дегидрогеназный комплекс (II), комплекс цитохромов *b/c₁* (III) и терминальную цитохром *c* оксидазу *aa₃*-типа (IV) (рис. 26; Таблица 16). Нами не были найдены типичные гены цитохромов *c* или пластоцианинов, которые переносят электроны от комплекса III к комплексу IV, однако *THTE_3354* кодирует достаточно крупный (258 аминокислот) белок, содержащий 2-гемовый цитохром *c*. Генов, кодирующих терминальные хинол-оксидазы *bd-*, *bo₃-* или *ba₃-*типа не было обнаружено.

Таблица 16. Комплексы аэробного дыхания у *T. terrifontis*

Комплекс	Субъединица	Белок
I (НАДН-дегидрогеназа)	A	THTE_0767
	B	THTE_0768
	C	THTE_0769
	D	THTE_0770
	E	THTE_0771
	F	THTE_0772
	G	THTE_0773
	H	THTE_0775
	I	THTE_0776
	J	THTE_0777
	K	THTE_0778
	L	THTE_0779
	M	THTE_0781
	N	THTE_0782
II (сукцинатдегидрогеназа)	SdhA	THTE_3869
	SdhB	THTE_3868
	SdhC	THTE_3870
III (<i>b/c₁</i> комплекс)	<i>c₁</i>	THTE_1510
	<i>b</i>	THTE_1511
	белок Риске	THTE_1512
IV (цитохром-оксидаза <i>aa₃</i> -типа)	I	THTE_2904
	II	THTE_2903
	III	THTE_2907
	IV	THTE_2908

T. terrifontis R1 является первым планктомицетом, для которого был показан рост за счет анаэробного дыхания, а именно за счет восстановления нитрата. Нитрат-редукция у *T. terrifontis* R1 происходит за счет работы двух комплексов: Nar и Nrf (рис. 26). В геноме были найдены гены всех трех субъединиц дыхательной цитоплазматической нитрат-редуктазы Nar (Simon and Klotz, 2013): *THTE_1509* (NarG), *THTE_1508* (NarH) и *THTE_1507* (NarI). Комплекс

NarGHI может образовывать суперкомплекс с электрогенной НАДН-дегидрогеназой (Simon and Klotz, 2013). Нами не была найдена дигемовая субъединица NarC, однако, возможно, комплекс цитохромов b/c₁ (*THTE_1510-THTE_1512*), гены которого расположены очень близко к генам NarGHI (*THTE_1509-THTE_1507*), вовлечен в электрон-транспортную цепь и генерацию протон-движущей силы в процессе анаэробного роста *T. terrifontis* с нитратом в качестве внешнего акцептора электронов. Нитрит, образуемый комплексом Nar, восстанавливается до аммония под действием неэлектрогенной периплазматической мембран-связанной нитрит-редуктазы Nrf (Simon and Klotz, 2013). Гены обеих субъединиц Nrf – каталитической NrfA (*THTE_1450*) и мембранной NrfH (*THTE_1449*) – были найдены в геноме.

9.6. Пути разложения ксантановой камеди и трегалозы, выявленные с использованием геномного и транскриптомного анализа

Для того чтобы понять механизм деградации ксантановой камеди, *T. terrifontis* R1 была выращена на ксантане и трегалозе (в качестве контроля), после чего были секвенированы и проанализированы транскриптомы клеток, выращенных на этих двух субстратах, чтобы оценить какие гены сверхэкспрессированы в том или ином случае. Трегалоза – дисахарид, состоящий из двух молекул глюкоз, связанных между собой 1-1-альфа-гликозидной связью, был одним из простых углеводов, обеспечивающих хороший рост штамма, и был выбран в качестве контроля. Разложение трегалозы, скорее всего, происходило под действием трегалозо-синтазы из GT4 (*THTE_2039*, рис. 27), осуществляющей обратную реакцию. Других известных ферментов, расщепляющих трегалозу (гликозидаз из семейств GH13, GH15, GH37 или GH65) не было обнаружено. Уровень экспрессии гена *THTE_2039* в культурах, выращенных на ксантановой камеди и трегалозе, был одинаков, что может быть объяснено тем, что фермент был активен при разных условиях роста, но, по-видимому, катализировал обратные реакции (Qu et al., 2004; Ryu et al., 2005).

Несмотря на широкое использование ксантановой камеди в косметической и пищевой промышленности, крайне мало известно о пути ее разложения. Для полного гидролиза этого соединения необходимо разрушить следующие связи: бета-манноза-1→4-альфа-глюкуронат, бета-глюкуронат-1→2-альфа-манноза, альфа-манноза-1→3-бета-глюкоза в боковых цепях и эндо-бета-1,4-гликозидные связи в бета-глюкановой основной цепи.

К известным ферментам, вовлеченным в разложение ксантановой камеди, можно отнести ксантан-лиазу (Hashimoto et al., 1998; Ruijssenaars et al., 1999) из семейства PL8, альфа-маннозидазу из семейства GH38, бета-глюкуронидазу и эндоксантазу (ксантан-

В геноме *T. terrifontis* не было обнаружено генов полисахаридлиаз из семейства PL8, к которому принадлежат все немногие известные ксантан-лиазы. Мы предполагаем, что вместо них действуют эндоманнаназы/бета-маннозидазы из семейства GH5 (THTE_1596, THTE_1734, THTE_3216, THTE_3333, THTE_3372, THTE_3386 и THTE_3787), расщепляющих связь Man(1β–4α)GlcA. Транскриптомный анализ показал, что гены двух из них, *THTE_3333* и *THTE_3787*, имели повышенную экспрессию.

Для расщепления связи GlcA(β1–2α)Man необходимы бета-глюкуронидазы. Все известные ферменты такого типа принадлежат к семействам GH1, GH2, GH30 и GH79. Тогда как гены гликозидаз из GH1, GH30 и GH79 отсутствовали в геноме штамма R1, 5 представителей GH2 (*THTE_0208*, *THTE_2104*, *THTE_2820*, *THTE_3433* and *THTE_3824*) были нами найдены. Поскольку это семейство содержит белки с разными активностями, мы попробовали определить специфичность белков штамма R1 с помощью филогенетического анализа. Все пять генов штамма R1 формировали отдельный кластер (рис. 28), отдаленный от всех охарактеризованных бета-галактозидаз и бета-глюкуронидаз, что не добавило аргументов ни «за» ни «против» приписывания именно бета-глюкуронидазной активности представителям GH2 штамма R1. В свою очередь транскриптомный анализ показал, что из них один ген (*THTE_2104*) имел повышенную экспрессию на ксантане, что послужило основой предположению, что, по крайней мере, продукт этого гена является бета-глюкуронидазой, участвующей в разложении ксантановой камеди.

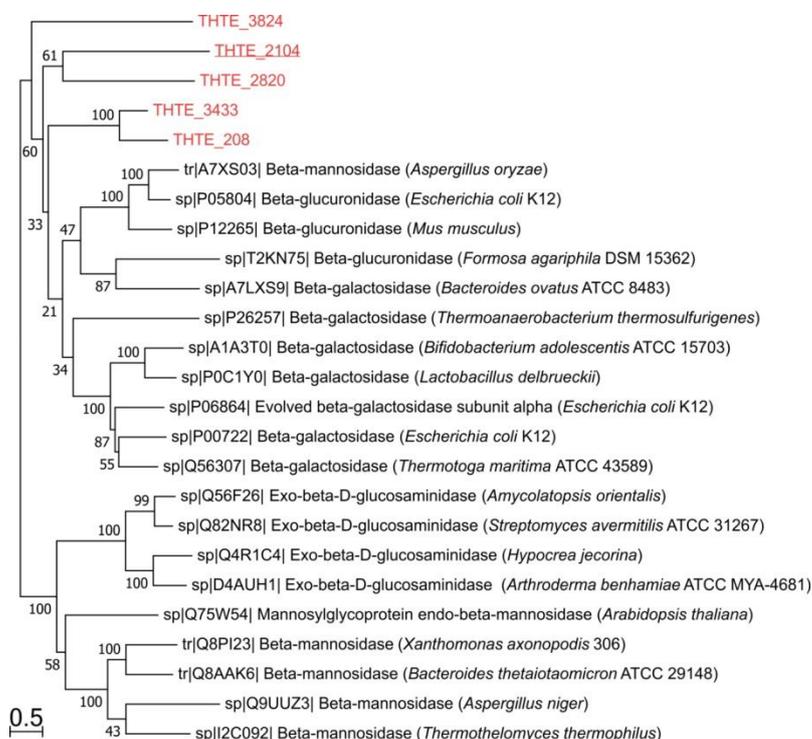


Рисунок 28. Филогенетический анализ (метод максимального правдоподобия) гликозидаз из семейства GH2: белки *T. terrifontis* R1 выделены красным, сверхэкспрессированный на ксантане *THTE_2104* подчеркнут.

Связь Man(1 α - β 3)Glc гидролизуется альфа-маннозидазой из семейства GH38 (TНTE_2605). Также можно предположить, что внеклеточная альфа-галактозидаза из семейства GH36 (TНTE_1560), гомологи которой могут гидролизовать ряд олигосахаридов различной структуры (Merceron et al., 2012) может быть ответственна за эту стадию. Оба гена, TНTE_2605 и TНTE_1560, имели повышенный уровень экспрессии при культивировании бактерии с ксантаном.

Основная цепь, звенья которой связаны связями Glc(β 1-4)Glc, может расщепляться гликозидазами из семейства GH5 (TНTE_0890, TНTE_1171 и TНTE_3688), однако ни один из этих генов не имел повышенной экспрессии на ксантане. Дополнительный поиск позволил нам обнаружить 9 потенциальных гликозидаз (TНTE_0474, TНTE_1038, TНTE_1454, TНTE_1561, TНTE_2480, TНTE_2853, TНTE_3338, TНTE_4089 и TНTE_4163), содержащих домен с неизвестными функциями (domain of unknown function) DUF1080. Два гена, TНTE_1561 и TНTE_4089, имели сверхэкспрессию при выращивании клеток с ксантаном. Такое количество генов, кодирующих предполагаемые гликозидазы, в ксантан-разлагающем микроорганизме, может отражать их роль в процессе гидролиза основной цепи (рис. 27, 29Б). Кроме того, примечательно, что DUF1080-содержащие белки высоко представлены в геномах *Planctomycetes* по сравнению с другими бактериями. Такие данные, дополненные тем, что ксантан является одним из селективных субстратов для планктомицетов (3.1.; Slobodkina et al., 2015; Elcheninov et al., 2019), указывают на важную роль DUF1080-содержащих белков в метаболизме ксантана. Все вместе, полученные результаты позволили нам предложить новый ферментативный каскад разложения ксантановой камеди (рис. 29).

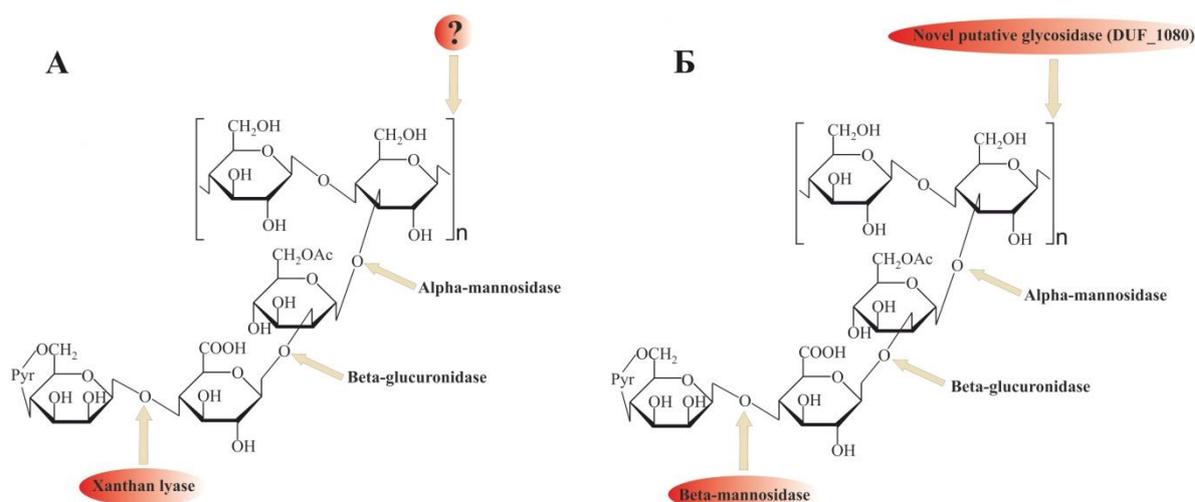


Рисунок 29. Сравнение (А) известного (с участием ксантан-лиазы) и (Б) предлагаемого нами (без ксантан-лиазы) путей разложения ксантана.

Продуктами гидролиза ксантана являются манноза, глюкуроонат и глюкоза. Несмотря на отсутствие генов маннокиназ, в геноме содержится ряд генов, кодирующих киназы из семейства ROK (*THTE_0095*, *THTE_2175*, *THTE_3207*, *THTE_4164*), представители которого могут фосфорилировать различные гексозы (Conejo et al., 2010; Nakamura et al., 2012). Образующийся маннозо-6-Ф переходит в фруктозо-6-Ф под действием маннозо-6-Ф-изомеразы (*THTE_1892*) и поступает в гликолиз (рис. 26, 27).

Окисление глюкуроновой кислоты идет через конверсию во фруктонат, последующее восстановление до манноната, дегидратацию до КДФГ и его расщепления на ФГА и пируват (рис. 27). Гены всех необходимых ферментов были найдены в геноме, кроме гена маннонат-оксидоредуктазы. Как и в случае альтронат-редуктазы (см. 3.3.4.), мы считаем, что некоторые short-chain редуктазы/дегидрогеназы (*THTE_2229*, *THTE_2632*, *THTE_3060*, *THTE_3480*, *THTE_3564* and *THTE_3622*) с неизвестными активностями, особенно *THTE_3564* (имеет повышенную экспрессию при культивировании штамма с ксантаном), могут действовать как маннонат-оксидоредуктаза.

Большинство генов, кодирующих ферменты центрального катаболизма сахаров, имеют либо одинаковый уровень экспрессии на ксантане и трегалозе, либо пониженную экспрессию в культуре, выращенной на ксантане (рис. 27). Это может быть связано с меньшей активностью при росте на ксантановой камеди всех остальных путей помимо путей разложения продуктов гидролиза ксантановой камеди и наоборот – более разнообразного метаболизма на легко усвояемой трегалозе (одна ферментативная реакция и перенос внутрь клетки).

ГЛАВА 10. АНАЛИЗ МЕТАБОЛИЗМА ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КЛАССА *PHYCISPHAERAE* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ГЕНОМИКИ

В классе *Phycisphaerae* на данный момент лишь 10 культивируемых видов, относящихся к девяти родам: *Phycisphaera* (Fukunaga et al., 2009), *Algisphaera* (Yoon et al., 2014), *Tepidisphaera* (Kovaleva et al., 2015), *Sedimentisphaera* (Spring et al., 2018), *Anaerohalosphaera* (Pradel et a., 2019), *Limihaloglobus* (Pradel et a., 2019), *Poriferisphaera* (Kallscheuer et al., 2020b), “*Humisphaera*” (Dedysh et al., 2021) и “*Mucisphaera*” (Kallscheuer et al., 2022), что свидетельствует о его крайне слабой изученности. При этом известны последовательности всех геномов кроме генома *Tepidisphaera mucosa*. В связи с этим с целью понимания метаболических возможностей представителей этого класса нами был проведен их сравнительный геномный анализ. Для этого нами был секвенирован геном *Tepidisphaera mucosa* 2842, а также подобраны геномы представителей *Phycisphaerae* (включая качественные геномы, собранные из метагеномов - «МАГи»), которые являются репрезентативной выборкой для всего класса, и проведен сравнительный геномный анализ.

10.1. Секвенирование генома *Tepidisphaera mucosa* 2842

Совместно с коллегами из БФУ им. Канта был секвенирован полный геном *Tepidisphaera mucosa* (рис. 30), первого культивируемого представителя *Phycisphaerae*, выделенного из горячего источника. Геном был собран в кольцевую хромосому, имел размер 3429215 п.о., доля Г+Ц составляла 53.47 мол. %. Всего в геноме было обнаружено 2988 белок-кодирующих генов, из которых 734 (24%) генов кодировали белки с неизвестной функцией. Были идентифицированы 3 гена рРНК и 45 генов тРНК.

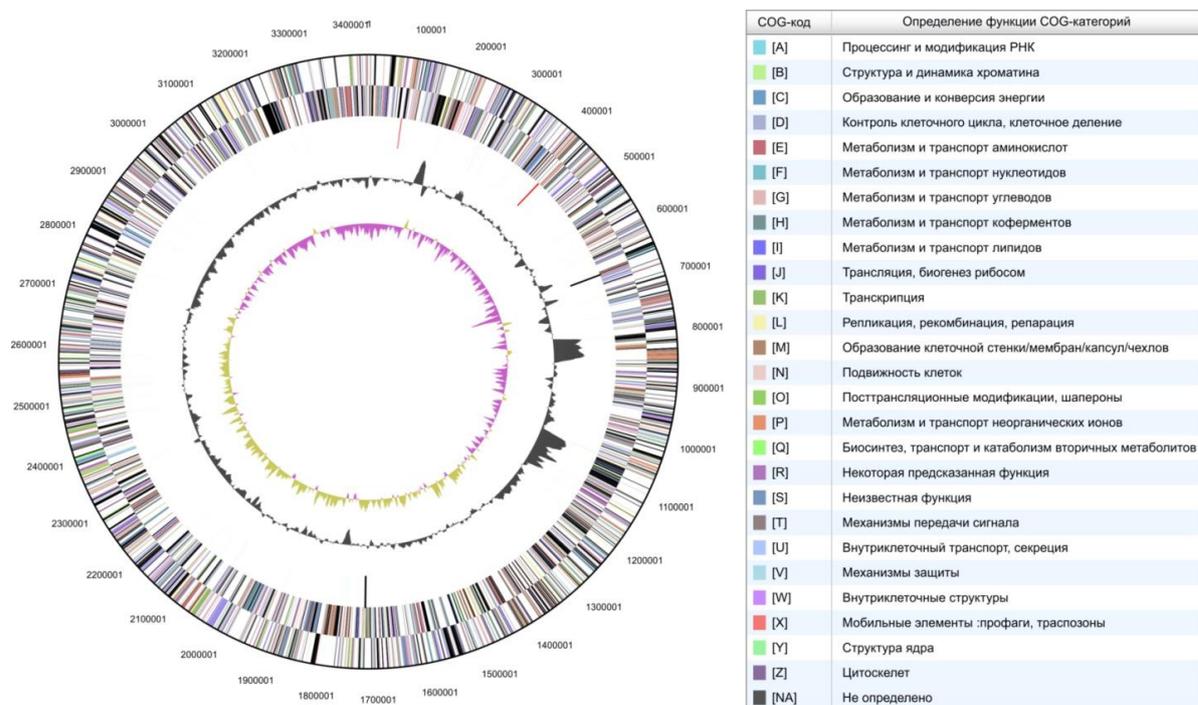


Рисунок 30. Карта хромосомы *T. mucosa* 2842. От внешней стороны к центру кольца расположены: гены на прямой цепи ДНК (окрашены в соответствии с COG-категориями), гены на обратной цепи ДНК (окрашены в соответствии с COG-категориями), рРНК (тРНК – зеленые линии, рРНК – красные, другие РНК – черные), содержание Г+Ц, смещение Г+Ц.

10.2. Подбор геномов *Phycisphaerae* и анализ их филогенетического положения

Поскольку класс *Phycisphaerae* изучен крайне слабо, нами были отобраны все геномы (в том числе геномы, собранные из метагеномов – MAG), отнесенные к *Phycisphaerae*, а также неклассифицированные геномы *Planctomycetes*, для того чтобы более полно исследовать их метаболизм с помощью сравнительной геномики. Полученные 893 генома были отфильтрованы по нескольким параметрам (рис. 31): 1) полнота (>90%) и контаминация (<5%); 2) значения ANI, чтобы отсеять почти полностью идентичные геномы (95%); 3) филогенетическое положение, чтобы определить позицию неклассифицированных геномов. В результате были отобраны 120 достаточно качественных и отличающихся друг от друга геномов, относящихся к классу *Phycisphaerae*, которые представляют репрезентативную выборку, представляющую весь класс.

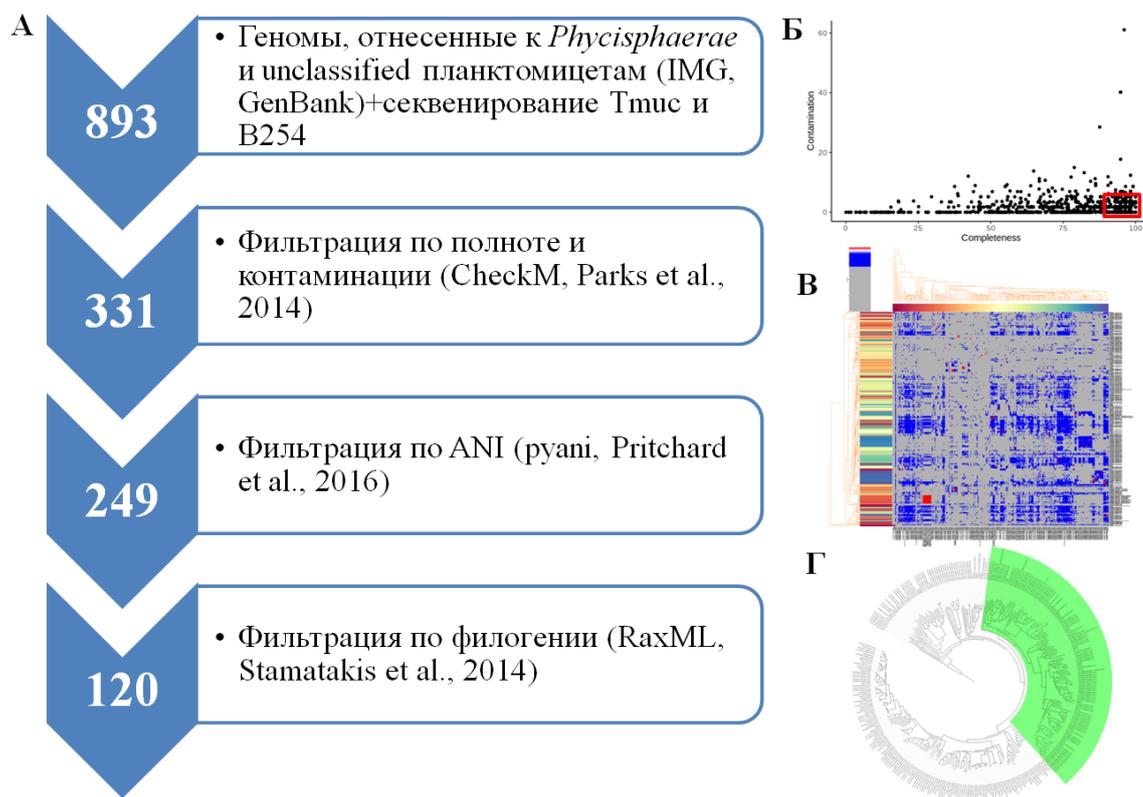


Рисунок 31. Фильтрация геномов из баз данных для выбора последовательностей *Phycisphaerae*, подходящих для последующего анализа: А – количество геномов, оставшихся после данного этапа фильтрации; Б – проверка полноты и контаминации (красной линией выделены выбранные геномы); В – матрица ANI для геномов, прошедших первый этап; Г – филогенетическое дерево, основанное сравнении белков bac120 (зеленым сектором отмечены представители *Phycisphaerae*).

Общие характеристики выбранных геномов сильно варьировали: размеры геномов составляли от 1.8 до 7.2 млн п.о. а Г+Ц состав – от 41 до 73% (рис. 32). Это объяснимо, так как геномы были получены из образцов, отобранных в самых разнообразных экосистемах: морские и пресные водоемы, почва, гиперсоленые отложения, горячие источники и другие (различные биореакторы, кишечник насекомых), и такая вариабельность может быть связана с адаптациями к конкретным экосистемам. Для геномов, полученных из термальных экосистем, можно отметить средний размер (2.46-5.54 млн п.о.) и повышенный Г+Ц состав (53.5-72.4%).

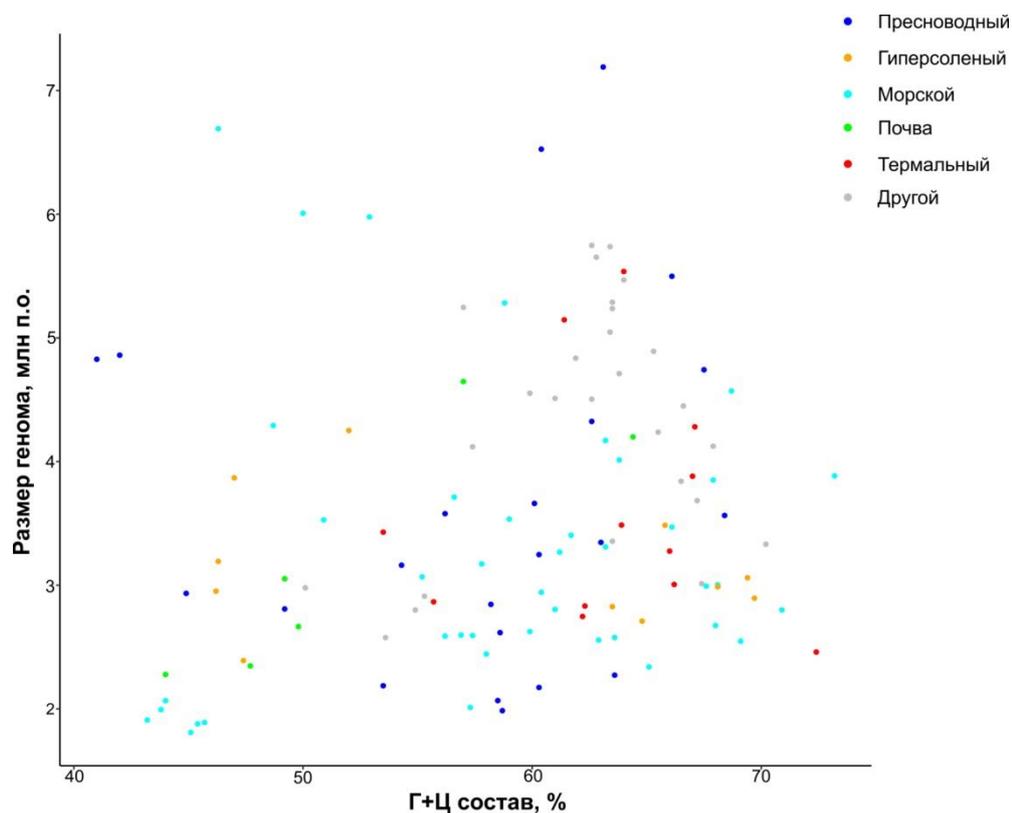


Рисунок 32. Размер и Г+Ц состав выбранных геномов *Phycisphaerae*

Филогеномный анализ показал, что выбранные геномы можно разделить на семь глубокий групп уровня порядка (рис. 33). Разные порядки включали от 1 (DG20) до 65 (*Phycisphaerales*) геномов. Стоит отметить, что лишь в трех порядках, *Phycisphaerales*, *Sedimentisphaerales* и *Tepidisphaerales*, на данный момент известны культивируемые представители. Такое разделение на группы в основном согласуется с классификацией GTDB (Parks et al., 2018).

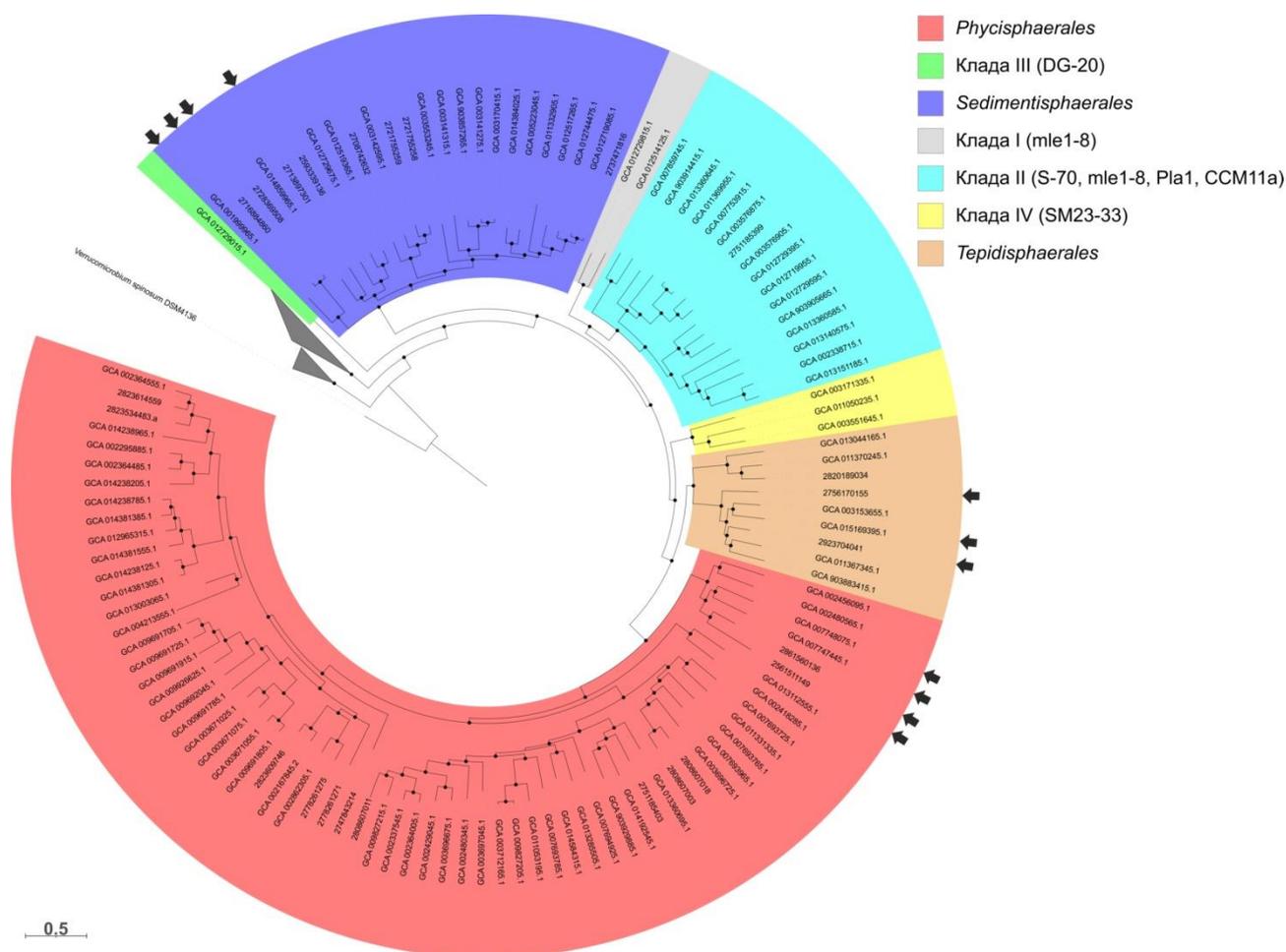


Рисунок 33. Филогеномное дерево, основанное на сравнении последовательностей 120 консервативных белков (*bac120*), отражающее разнообразие внутри класса *Phycisphaerae*: стрелками обозначено положение культивируемых представителей.

10.3. Сравнительный анализ метаболизма представителей *Phycisphaerae* с использованием геномики

Для оценки сходства метаболических характеристик разных групп внутри класса *Phycisphaerae* была проведена NMDS кластеризация геномов на основании общего набора COG (рис. 34). Полученные данные показывают, что геномы представителей порядков *Sedimentisphaerales*, *Phycisphaerales* и Candidate Order IV (группа SM23-33) кластеризовались достаточно компактно, что говорит об общности метаболизма в пределах группы. В то же время порядки *Tepidisphaerales* и Candidatus Order II (группы S-70, mle1-8, Pla1, CCM11a) не показали четкой кластеризации, что может быть вызвано большим разнообразием метаболизма в соответствующих кластерах или недостаточным количеством доступных геномов.

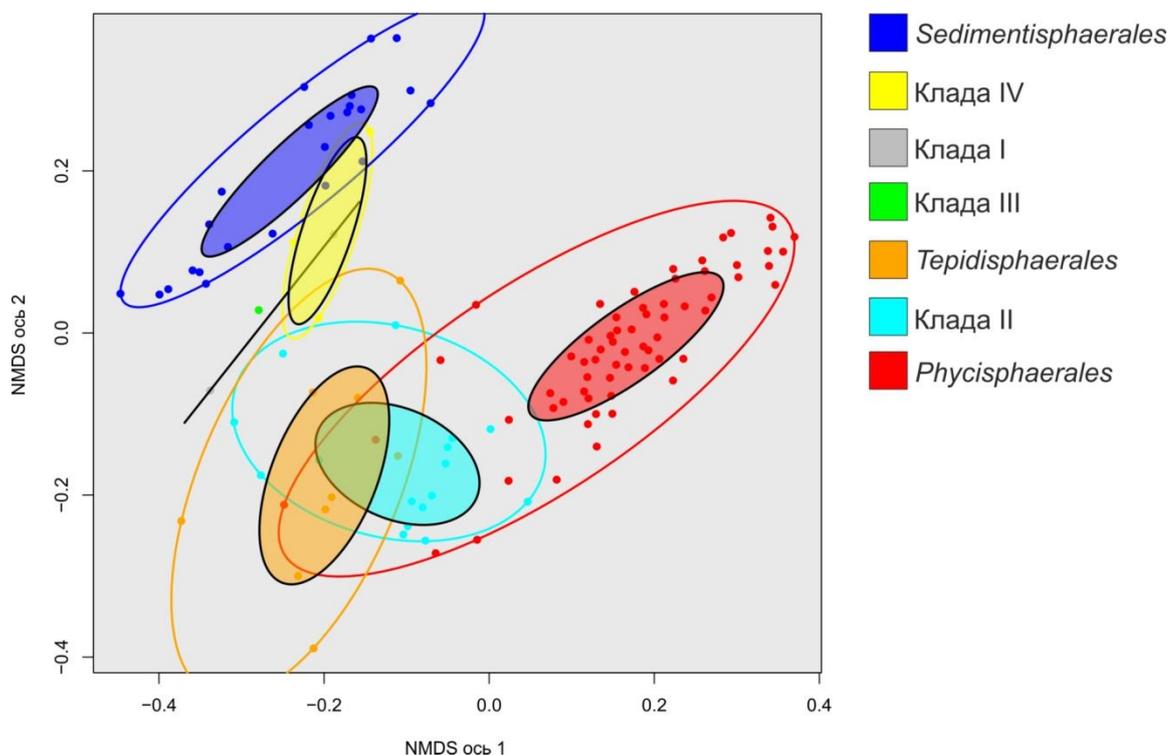


Рисунок 34. Кластеризация геномов *Phycisphaerae*, выполненная с использованием NMDS ординации на основании сходства наборов COG (уровень стресса – 0.121).

По типу метаболизма все культивируемые организмы, относящиеся к классу *Phycisphaerae*, являются полисахаридолитиками, в связи с чем был проведен поиск генов специфических ферментов, участвующих в разложении углеводов (CAZymes) в исследуемых геномах. Основными ферментами, участвующими в разложении полисахаридов, являются гликозидазы (GH) и полисахаридлиазы (PL), поэтому именно этим ферментам уделялось больше внимания. Количество генов GH и PL сильно варьировало между геномами (рис. 35): от 1 (GCA_014381555.1, порядок *Phycisphaerales*) до 285 (GCA_012729815.1, Ca. Order I (mle1-8)). Самые значительные суммарные наборы GH и PL наблюдали в порядках *Tepidisphaerales* и *Sedimentisphaerales*, при этом полисахаридлиаз во всех случаях было меньше чем гликозидаз. Наоборот, наименьшее количество генов GH и PL было обнаружено в геномах, относящихся к *Phycisphaerales*, что подразумевает меньшую вариативность в спектре разлагаемых полисахаридов у планктомицетов этого порядка.

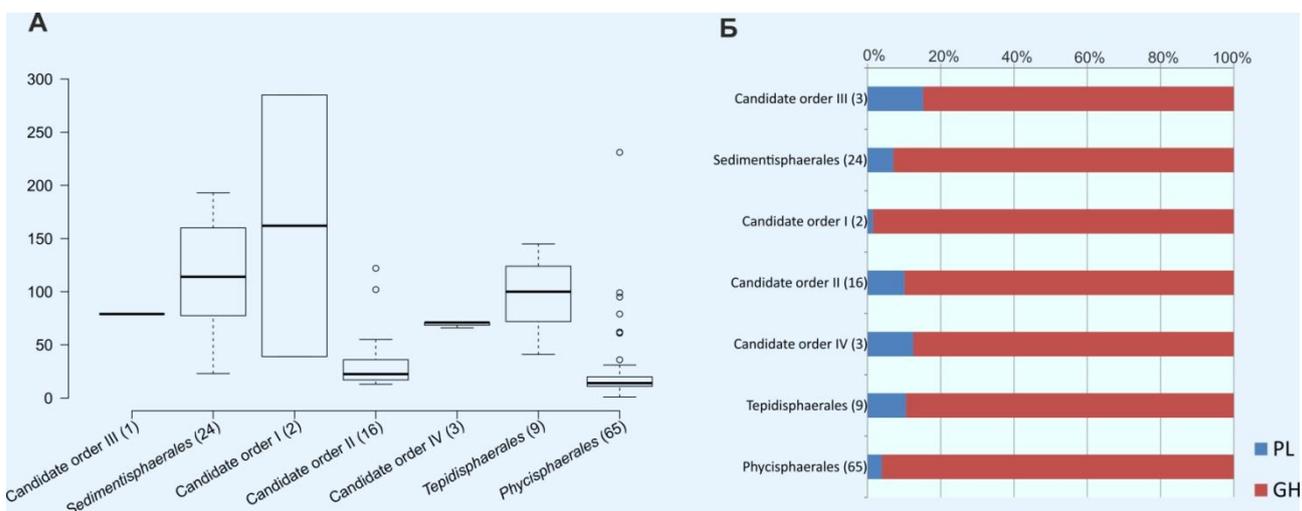


Рисунок 35. Количество генов GH и PL, найденных в геномах *Phycisphaerae* (цифры в скобках обозначают количество геномов в соответствующей группе): А – распределение количества генов CAZymes в разных группах; Б – соотношение количества гликозидаз и полисахаридлиаз.

Оценив различия в общем количестве ферментов, мы решили провести дополнительный анализ представленности конкретных семейств гликозидаз и полисахаридлиаз (рис. 36). Самыми массовыми семейства были GH2, GH13, GH29, GH43, GH5, GH33, GH78, GH10, GH57, GH38, GH16, GH20, GH130, GH51, GH106, GH165, GH31, GH3, GH133, GH28, GH95. Ферменты из семейства GH13, GH57, GH133 отвечают за гидролиз глюконов с альфа-связями (крахмал, декстрин, пуллулан). Среди представителей GH43 и GH51 можно обнаружить эндо-альфа-арабиназы и альфа-арабинозидазы, что позволяет использовать арабинан и отщеплять остатки арабинозы в гетерополисахаридах. Гидролиз основных компонентов клеточных стенок растений, целлюлозы, ксилана, ксилоглюкана, осуществляют ферменты семейств GH3, GH5, GH10 и GH16. Семейство гликозидаз GH28 отвечает за разложение пектина. Для *Tepidisphaerales* набор самых многочисленных семейств CAZymes сходный с «обобщенным»: GH2, GH4, GH10, GH29, GH78, GH165, GH28, GH13, GH5, GH43, GH42, GH94, GH51, GH50 и PL1. Однако он все же немного отличается в деталях: у *Tepidisphaerales* относительно больше GH4, GH42, GH94, GH50, а также PL1 (пектат-лиазы).

В геноме *Tepidisphaera mucosa* было обнаружено 158 генов CAZymes: 65 генов, гликозидаз, 20 генов полисахаридлиаз, 13 генов углеводэстераз, 2 гена углеводоксидаз, а также многочисленные гликозил-трансферазы. Выявленный набор CAZymes позволяет штамму 2842 утилизировать широкий спектр различных полисахаридов, в том числе соединения, рост на которых не был проверен в статье с описанием данного штамма (Kovaleva et al., 2015). Например, штамм 2842 может расти на ксилоглюкане (за счет наличия генов ксилоглюканазы (GH5), бета-галактозидаз (GH2) и альфа-фукозидаз (GH29)) и галактане (за счет работы эндо-бета-1,4-галактаназы (GH53) и бета-галактозидаз (GH2)). Помимо биоинформатического

анализа возможность гидролиза данных субстратов этим микроорганизмом было нами подтверждено с помощью ростовых экспериментов.

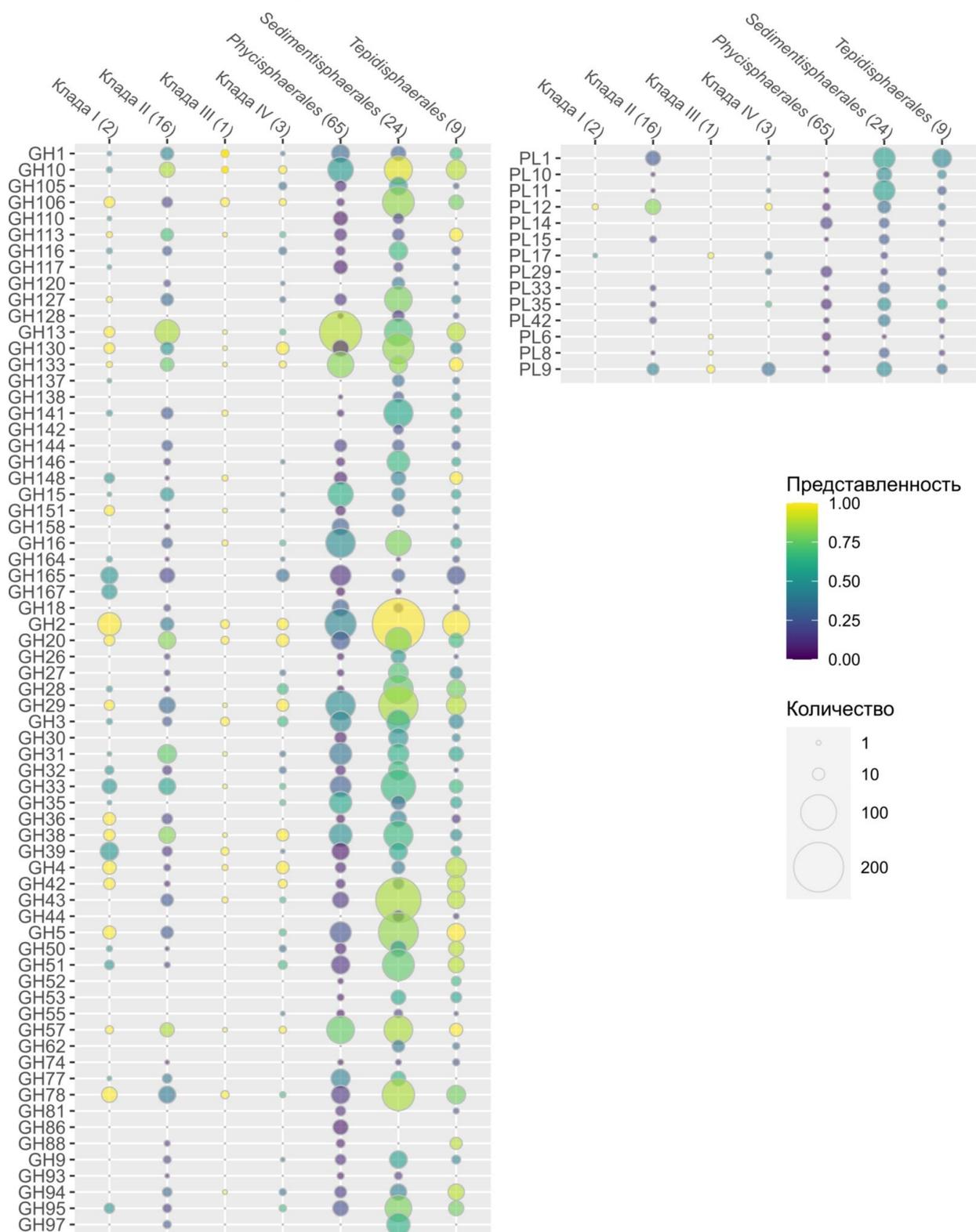


Рисунок 36. Распределение представителей семейств гликозидаз и полисахаридиаз, гены которых были найдены в исследуемых геномах *Phycisphaerae*: размер круга отражает суммарное количество генов; цветовая шкала отражает представленность семейства у соответствующей группы геномов.

Помимо возможностей гидролиза различных полисахаридов, было проведено исследование путей центрального метаболизма сахаров, брожения и аэробного дыхания (рис. 37). В геноме GCA_012729015.1, единственного представителя Ca. Order III (DG-20), были обнаружены гены, кодирующие некоторые комплексы аэробного дыхания: НАДН-дегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа и комплекса цитохромов *b/c₁*. При этом не было найдено генов терминальных цитохром-оксидаз или хинол-оксилаз. Также, вероятно, этот организм может бродить с образованием ацетата (с помощью ацетил-фосфотрансферазы и ацетаткиназы) и водорода (с помощью [NiFe], а также [FeFe]-гидрогеназы). В свою очередь почти у всех представителей порядка *Sedimentisphaerales* отсутствуют комплексы аэробного дыхания. Исключениями являются GCA_003142595.1 (есть НАДН-дегидрогеназный комплекс) и GCA_005223045.1 (найдена сукцинатдегидрогеназа). Также у всех обнаружили гены, кодирующие ферменты, участвующие в разных типах брожения: ацетаткиназа, ацетил-коА лигаза, лактатдегидрогеназы, бутирил-коА:ацетат-коА трансфераза, гидрогеназы. Такие данные вполне согласуются с тем, что все культивируемые представители этого порядка - облигатные анаэробы (Spring et al., 2018). Наборы генов в двух геномах, относящихся к Ca. Order I (mle1-8), несколько различаются. Так, в GCA_012729815.1 были найдены гены НАДН-дегидрогеназы, альтернативного комплекса III, хинол-оксидазы bd-типа и цитохром-оксидазы *aa3*-типа. Также в обоих геномах присутствовали гены, кодирующие ацетил-фосфотрансферазу, ацетаткиназу, лактатдегидрогеназу и несколько гидрогеназ. Группа Ca. Order II является достаточно разнообразной в плане энергетического метаболизма и в их геномах можно обнаружить как гены различных комплексов аэробного дыхания (НАДН-дегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, *b/c₁*-комплекс, альтернативный комплекс III, хинол-оксидаза, цитохром-оксидазы типов *aa3* и *bb3*) так и ферментов брожения с образованием ацетата (ацетат—коА-лигаза, ацетил-фосфотрансфераза, ацетаткиназа), пропионата, бутирата, этанола (пируватдекарбоксилаза, ацетальдегид-дегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа) и водорода (различные [NiFe] и [FeFe] гидрогеназы). В порядке Ca. Order IV (SM23-33) также присутствуют как факультативный анаэроб GCA_003171335.1, обладающий как комплексами аэробного дыхания (НАДН-хинон-оксидоредуктаза, альтернативный комплекс III и цитохром-оксидаза типа *bb3*), так и ферментами брожения. Два других микроорганизма, относящиеся к этой группе, скорее всего, могут только бродить с образованием ацетата, бутирата, этанола и водорода. Геномный анализ *Tepidisphaerales* указывает на факультативно анаэробный метаболизм его представителей, что подтвердилось ростовыми экспериментами для *Tepidisphaera mucosa* (Kovaleva et al., 2015) и “*Fontivita pretiosa*” (Podosokorskaya et al., submitted), однако не для “*Humisphaera borealis*”, который был описан как микроаэрофил (Dedysh et al., 2021). В геномах *Tepidisphaerales* были обнаружены как гены, кодирующие

комплексы аэробного дыхания (НАДН-хинон-оксидоредуктаза, сукцинатдегидрогеназа, альтернативный комплекс III, хинол-оксидаза и цитохром-оксидазы двух типов), так и гены ферментов, отвечающих за брожение с образованием различных продуктов: ацетата, пропионата, лактата, этанола и водорода. Представители порядка *Phycisphaerales* показывают сходные с *Teptidisphaerales* наборы генов аэробного дыхания, но при этом у них было найдено меньше генов, отвечающих за брожение.

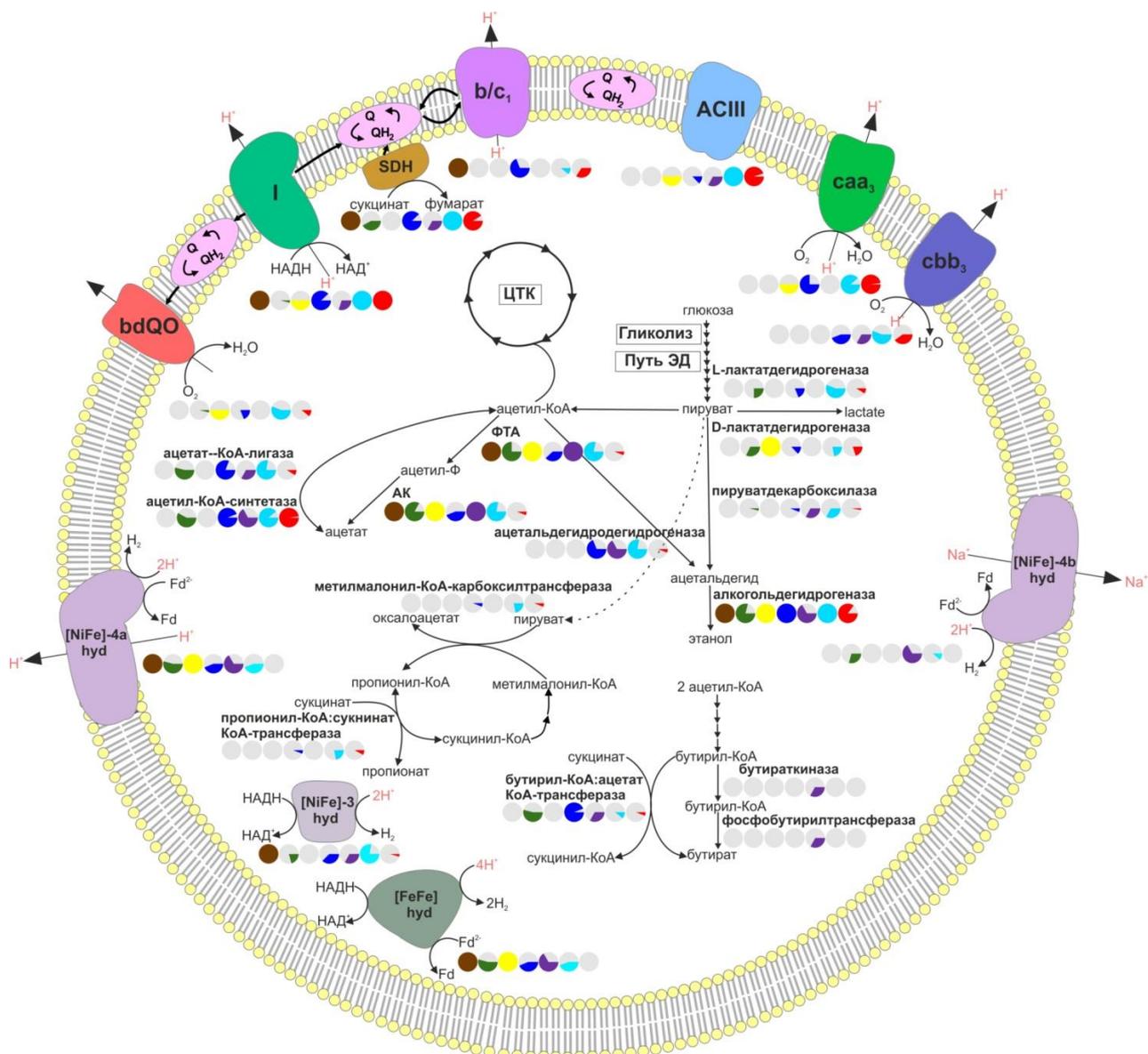


Рисунок 37. Схема путей запасаения энергии у представителей *Phycisphaerae*, основанная на проведенном геномном анализе: hyd – гидрогеназа, Q – хинон, *bdQO* – хинол-оксидаза *bd*-типа, I – НАДН-дегидрогеназный комплекс, *SDH* – сукцинатдегидрогеназа, *ACIII* – альтернативный комплекс III, *caa3* – цитохром-оксидаза *aa3*-типа, *cbb3* – цитохром-оксидаза *bb3*-типа, ЦТК – цикл трикарбоновых кислот, путь ЭД – путь Энтнера-Дудорова. Цветные круги обозначают процентное отношение геномов внутри каждой клады, у которых обнаружен данный ген: коричневый – Клада III (DG-20); зеленый – порядок *Sedimentisphaerales*; желтый – Клада I (mle1-8); синий – Клада II; фиолетовый – Клада IV (SM23-33); бирюзовый – порядок *Teptidisphaerales*; красный – порядок *Phycisphaerales*.

Таким образом, нами было показано, что в классе *Phycisphaerae* существуют две метаболические группы органогетеротрофов: 1) облигатно анаэробные микроорганизмы, которые способны бродить (способность к анаэробному дыханию требует дополнительной проверки) и 2) факультативно анаэробные организмы, которые могут как аэробно дышать, так и бродить.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были подобраны селективные условия для выделения планктомицетов из горячих источников, позволяющие получить накопительные культуры, в которых планктомицеты составляют одну из доминирующих в сообществе групп – вплоть до 74%. Благодаря этому удалось выделить ряд чистых культур, одна из которых представляет новый род в классе *Phycisphaerae* (“*Fontivita pretiosa*” В-254). Два штамма, GM2012 и 2918, были описаны как представители новых родов *Tautonia sociabilis* и *Thermogemmata fonticola*, соответственно, исходя из филогенетического и хемотаксономического анализов, а также их фенотипических свойств.

С применением сравнительно-геномного анализа был детально исследован метаболизм двух выделенных ранее термофильных планктомицетов – *Tepidisphaera mucosa* 2842 и *Thermogutta terrifontis* R1. Были выявлены гены, кодирующие ферменты гидролиза полисахаридов, центральный катаболизм сахаров, пути запасания энергии (брожение, аэробное и анаэробное дыхание). Для *Thermogutta terrifontis* был детально *in silico* реконструирован весь процесс гидролиза полисахаридов, а также центральный метаболизм сахаров; предложен новый путь разложения ксантановой камеди на основе результатов геномного и транскриптомного анализов. Был проведен сравнительно-геномный анализ 120 культивируемых и некультивируемых представителей *Phycisphaerae*. Было показано, что класс *Phycisphaerae* состоит, как минимум, из 7 монофилетических групп уровня порядка, которые, по всей видимости, сильно различаются метаболически. Во всех геномах были обнаружены гены CAZymes: количество гликозидаз и полисахаридлиаз варьировало от 1 до 285, что говорит о разной приспособленности этих организмов к росту на полисахаридах. У представителей некоторых групп (порядок *Sedimentisphaerales* и частично группы m1e1-8 и SM23-33) отсутствовала часть генов ЦТК и комплексов аэробного дыхания, с чем связана их неспособность к аэробному росту.

Таким образом, нам удалось охарактеризовать два новых рода планктомицетов из семейств *Isosphaeraceae* и *Gemmataceae*, обитающих в термальных местообитаниях. Использование геномики и транскриптомики позволило предложить новый путь разложения ксантановой камеди; также сравнительно-геномный анализ позволил существенно расширить представления о гидролитической активности и центральном метаболизме сахаров и механизмах запасания энергии у представителей филума *Planctomycetes*.

ВЫВОДЫ

1. Охарактеризован новый род и вид планктомицетов, *Tautonia sociabilis* (семейство *Isosphaeraceae*). Типовой штамм нового вида, GM2012, выделенный из золотодобывающей шахты ТауТона (ЮАР), оптимально растет при 42 °С и использует в качестве субстратов углеводы, в том числе ксантановую камедь и крахмал.
2. На основании изучения характеристик штамма 2918, выделенного из горячего источника около р. Карымша (Камчатка, Россия), описан новый род и вид термофильных планктомицетов, *Thermogemmata fonticola* (семейство *Gemmataceae*). Представитель нового таксона оптимально растет при 54-60 °С и использует в качестве субстратов моно- и полисахариды, в том числе ксантановую камедь, арабинан, галактан, крахмал, лихенан и бета-глюкан.
3. Анализ генома *Thermogutta terrifontis* R1 позволил раскрыть широкие возможности гидролиза полисахаридов этой бактерией. Центральный катаболизм моносахаридов включает в себя гликолиз, модифицированный пентозо-фосфатный путь и цикл трикарбоновых кислот. Запасание энергии происходит за счет: 1) кислородного дыхания – в аэробных условиях, 2) нитратного дыхания – в анаэробных условиях при наличии нитрата и 3) брожения – в анаэробных условиях при отсутствии внешнего акцептора электронов.
4. На основании результатов геномного и транскриптомного анализов предложен новый путь деструкции ксантановой камеди у *Thermogutta terrifontis* R1. Ключевой особенностью пути является участие белков, содержащих домен с неопределенной функцией DUF1080, гены которых перепредставлены в геномах многих представителей *Planctomycetes*.
5. Проанализирован набор генов *Tepidisphaera mucosa* 2842, кодирующих гликозидазы и полисахаридлиазы. Предсказана и экспериментально подтверждена способность *T. mucosa* расти на галактане и ксилоглюкане.
6. Показано, что класс *Phycisphaerae* представлен семью глубокими линиями уровня порядка, четыре из которых пока не содержат культивируемых представителей. Выявлено, что класс включает планктомицетов двух метаболических групп: 1) облигатные анаэробы, лишившиеся некоторых генов ЦТК и комплексов аэробного дыхания и 2) факультативные анаэробы, способные как к аэробному дыханию, так и к различным типам брожения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

AAI – average amino acid identity (среднее сходство по аминокислотам)

ANI – average nucleotide identity (среднее сходство по нуклеотидам)

CAZymes – carbohydrate-active enzymes (ферменты, действующие на полисахариды)

CE – carbohydrate esterase (карбогидратэстераза)

COG – cluster of orthologous group (кластер группы ортологов)

DUF – domain of unknown function (домен с неизвестной функцией)

GH – glycoside hydrolase (гликозидгидролаза)

MAG – metagenome-assembled genome (геном, собранный из метагенома)

PL – polysaccharide lyase (полисахаридлиаза)

PP_i – неорганический пирофосфат

Q – хинон

Анаммокс – anaerobic ammonium oxidation (анаэробное окисление аммония)

АТФ – аденозинтрифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КДФГ – 2-кето-3-дезоксиглюконоат

КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза

ПГ – пептидогликан

РНК/рРНК/тРНК - рибонуклеиновая кислота/рибосомная РНК/транспортная РНК

ФВК – фосфовольфрамовая кислота

ФГА – глицеральдегид-3-фосфат

ЦТК/вЦТК – цикл трикарбоновых кислот/восстановительный цикл трикарбоновых кислот

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кевбрин В.В. и Заварзин Г.А. Влияние соединений серы на рост галофильной гомоацетатной бактерии *Acetohalobium arabaticum* // *Микробиология*, 1992, т. 61, № 5, с. 812–817.
2. Куличевская И.С., Наумов Д.Г., Иванова А.А., Ракитин А.Л., и Дедыш С.Н. Выявление хитинолитического потенциала у пресноводного планктомицета *Planctomicrobium piriforme* // *Микробиология*, 2019, т. 88, № 4, с. 426–437, doi: 10.1134/s0026365619040074.
3. Aziz R.K., Bartels D., Best A.A., DeJongh M., Disz T., Edwards R.A., Formsma K., Gerdes S., Glass E.M., Kubal M., Meyer F., Olsen G.J., Olson R., Osterman A.L., Overbeek R.A., McNeil L.K., *et al.* The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology // *BMC Genomics*, 2008, vol. 9, p. 75, doi: 10.1186/1471-2164-9-75.
4. Bairoch A., Boeckmann B., Ferro S., and Gasteiger E. Swiss-Prot: juggling between evolution and stability // *Brief. Bioinform.*, 2004, vol. 5, no. 1, pp. 39–55, doi: 10.1093/bib/5.1.39.
5. Balabanova L., Slepchenko L., Son O., and Tekutyeva L. Biotechnology potential of marine fungi degrading plant and algae polymeric substrates // *Front. Microbiol.*, 2018, vol. 9, no. 1527, pp. 1–15, doi: 10.3389/fmicb.2018.01527.
6. 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., and Pevzner P.A. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // *J. Comput. Biol.*, 2012, vol. 19, no. 5, pp. 455–477, doi: 10.1089/cmb.2012.0021.
7. Bauld J. and Staley J. *Planctomyces maris* sp. nov.: a marine isolate of the *Planctomyces-Blastocaulis* group of budding bacteria // *J. Gen. Microbiol.*, 1976, vol. 97, pp. 45–55.
8. Bendtsen J.D., Jensen L.J., Blom N., Von Heijne G., and Brunak S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion // *Protein Eng. Des. Sel.*, 2004, vol. 17, no. 4, pp. 349–356, doi: 10.1093/protein/gzh037.
9. Bengtsson M.M. and Øvreås L. Planctomycetes dominate biofilms on surfaces of the kelp *Laminaria hyperborean* // *BMC Microbiol.*, 2010, vol. 10, no. 261, pp. 1–12, doi: 10.1186/1471-2180-10-261.
10. Berlanga M., Llorens C., Comas J., and Guerrero R. Gut bacterial community of the xylophagous cockroaches *Cryptocercus punctulatus* and *Parasphaeria boleiriana* // *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 4, pp. 1–16, doi: 10.1371/journal.pone.0152400.
11. Biely P. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides // *Biotechnol. Adv.*, 2012, vol. 30, no. 6, pp. 1575–1588, doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.04.010.

12. Boedeker C., Schüler M., Reintjes G., Jeske O., van Teeseling M.C.F., Jogler M., Rast P., Borchert D., Devos D.P., Kucklick M., Schaffer M., Kolter R., van Niftrik L., Engelmann S., Amann R., Rohde M., *et al.* Determining the bacterial cell biology of *Planctomycetes* // *Nat. Commun.*, 2017, vol. 8, no. 14853, pp. 1–14, doi: 10.1038/ncomms14853.
13. Boetzer M. and Pirovano W. Toward almost closed genomes with GapFiller // *Genome Biol.*, 2012, vol. 13, no. 6, p. R56, doi: 10.1186/gb-2012-13-6-r56.
14. Boetzer M., Henkel C.V., Jansen H.J., Butler D., and Pirovano W. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE // *Bioinformatics*, 2011, vol. 27, no. 4, pp. 578–579, doi: 10.1093/bioinformatics/btq683.
15. Bonch-Osmolovskaya E.A., Sokolova T.G., Kostrikina N.A., and Zavarzin G.A. *Desulfurella acetivorans* gen. nov. and sp. nov. - a new thermophilic sulfur-reducing eubacterium // *Arch. Microbiol.*, 1990, vol. 153, no. 2, pp. 151–155, doi: 10.1007/BF00247813.
16. Bondoso J., Albuquerque L., Lobo-da-Cunha A., da Costa M.S., Harder J., and Lage O.M. *Rhodopirellula lusitana* sp. nov. and *Rhodopirellula rubra* sp. nov., isolated from the surface of macroalgae // *Syst. Appl. Microbiol.*, 2014, vol. 37, no. 3, pp. 157–164, doi: 10.1016/j.syapm.2013.11.004.
17. Bondoso J., Albuquerque L., Nobre M.F., Lobo-da-Cunha A., da Costa M.S., and Lage O.M. *Roseimaritima ulvae* gen. nov., sp. nov. and *Rubripirellula obstinata* gen. nov., sp. nov. two novel planctomycetes isolated from the epiphytic community of macroalgae // *Syst. Appl. Microbiol.*, 2015, vol. 38, no. 1, pp. 8–15, doi: 10.1016/j.syapm.2014.10.004.
18. Bondoso J., Albuquerque L., Nobre M.F., Lobo-da-Cunha A., da Costa M.S., and Lage O.M. *Aquisphaera giovannonii* gen. nov., sp. nov., a planctomycete isolated from a freshwater aquarium // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2011, vol. 61, no. 12, pp. 2844–2850, doi: 10.1099/ijss.0.027474-0.
19. Bondoso J., Godoy-Vitorino F., Balagué V., Gasol J.M., Harder J., and Lage O.M. Epiphytic Planctomycetes communities associated with three main groups of macroalgae // *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2017, vol. 93, no. 3, pp. 1–9, doi: 10.1093/femsec/fiw255.
20. Brümmer I.H.M., Felske A.D.M., and Wagner-Döbler I. Diversity and seasonal changes of uncultured // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, vol. 70, no. 9, pp. 5094–5101, doi: 10.1128/AEM.70.9.5094.
21. Buckley D.H., Huangyutitham V., Nelson T.A., Rumberger A., and Thies J.E. Diversity of *Planctomycetes* in soil in relation to soil history and environmental heterogeneity // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 7, pp. 4522–4531, doi: 10.1128/AEM.00149-06.

22. Capella-Gutiérrez S., Silla-Martínez J.M., and Gabaldón T. trimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses // *Bioinformatics*, 2009, vol. 25, no. 15, pp. 1972–1973, doi: 10.1093/bioinformatics/btp348.
23. Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis // *Mol. Biol. Evol.*, 2000, vol. 17, no. 4, pp. 540–552, doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334.
24. Cayrou C., Sambe B., Armougom F., Raoult D., and Drancourt M. Molecular diversity of the planctomycetes in the human gut microbiota in France and Senegal // *Apmis*, 2013, vol. 121, no. 11, pp. 1082–1090, doi: 10.1111/apm.12087.
25. Chen I.A., Chu K., Palaniappan K., Pillay M., Ratner A., Huang J., Huntemann M., Varghese N., White J.R., Seshadri R., Smirnova T., Kirton E., Jungbluth S.P., Woyke T., Ivanova N.N., and Kyrpides N.C. IMG/M v. 5.0: an integrated data management and comparative analysis system for microbial genomes and microbiomes // *Nucleic Acids Res.*, 2019, vol. 47, pp. 666–677, doi: 10.1093/nar/gky901.
26. Chothia C. and Lesk A.M. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins // *EMBO J.*, 1986, vol. 5, no. 4, pp. 823–6.
27. Conejo M.S., Thompson S.M., and Miller B.G. Evolutionary bases of carbohydrate recognition and substrate discrimination in the ROK protein family // *J. Mol. Evol.*, 2010, vol. 70, no. 6, pp. 545–556, doi: 10.1007/s00239-010-9351-1.
28. Dabin J., Jam M., Czjzek M., and Michel G. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the polysaccharide lyase RB5312 from the marine planctomycete *Rhodopirellula baltica* // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 2008, vol. 64, no. 3, pp. 224–227, doi: 10.1107/S1744309108004387.
29. de Gannes V., Eudoxie G., and Hickey W.J. Prokaryotic successions and diversity in composts as revealed by 454-pyrosequencing // *Bioresour. Technol.*, 2013, vol. 133, pp. 573–580, doi: 10.1016/j.biortech.2013.01.138.
30. DeCastro M.E., Rodríguez-Belmonte E., and González-Siso M.I. Metagenomics of thermophiles with a focus on discovery of novel thermozyms // *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, no. 1521, pp. 1–21, 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.01521.
31. Dedysh S.N. and Ivanova A.A. Planctomycetes in boreal and subarctic wetlands: Diversity patterns and potential ecological functions // *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2019, vol. 95, no. 2, pp. 1–10, doi: 10.1093/femsec/fiy227.
32. Dedysh S.N., Beletsky A.V., Ivanova A.A., Kulichevskaya I.S., Suzina N.E., Philippov D.A., Rakitin A.L., Mardanov A.V., and Ravin N.V. Wide distribution of *Phycisphaera*-like planctomycetes from WD2101 soil group in peatlands and genome analysis of the first

- cultivated representative // *Environ. Microbiol.*, 2021, vol. 23, no. 3, pp. 1510–1526, doi: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15360>.
33. Dedysh S.N., Kulichevskaya I.S., Beletsky A.V., Ivanova A.A., Rijpstra W.I.C., Damsté J.S.S., Mardanov A.V., and Ravin N.V. *Lacipirellula parvula* gen. nov., sp. nov., representing a lineage of planctomycetes widespread in low-oxygen habitats, description of the family *Lacipirellulaceae* fam. nov. and proposal of the orders *Pirellulales* ord. nov., *Gemmatales* ord. nov. and *Isosphaerales* ord. nov. // *Syst. Appl. Microbiol.*, 2020, vol. 43, no. 1, p. 126050, doi: 10.1016/j.syapm.2019.126050.
 34. Delgado-Baquerizo M., Oliverio A.M., Brewer T.E., Benavent-gonzález A., Eldridge D.J., Bardgett R.D., Maestre F.T., Singh B.K., and Fierer N. A global atlas of the dominant bacteria found in soil // *Science*, 2018, vol. 359, pp. 320–325, doi: 10.1126/science.aap9516.
 35. Devos D.P. and Reynaud E.G. Intermediate steps // *Science*, 2010, vol. 330, no. 6008, pp. 1187–1188, doi: 10.1126/science.1196720.
 36. Dimont E., Shi J., Kirchner R., and Hide W. EdgeRun: An R package for sensitive, functionally relevant differential expression discovery using an unconditional exact test // *Bioinformatics*, 2015, vol. 31, no. 15, pp. 2589–2590, doi: 10.1093/bioinformatics/btv209.
 37. Drees K. P., Neilson J. W., Betancourt J.L., Quade J., Henderson D.A., Pryor B.M., and Maier R.M. Bacterial community structure in the hyperarid core of the Atacama Desert, Chile // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 12, pp. 7902–7908, doi: 10.1128/AEM.01305-06.
 38. Faria M., Bordin N., Kizina J., Harder J., Devos D., and Lage O.M. Planctomycetes attached to algal surfaces: Insight into their genomes // *Genomics*, 2018, vol. 110, no. 5, pp. 231–238, doi: 10.1016/j.ygeno.2017.10.007.
 39. Felsenstein J.S. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution*, 1985, vol. 39, no. 4, pp. 783–791.
 40. Finn R.D., Bateman A., Clements J., Coggill P., Eberhardt R.Y., Eddy S.R., Heger A., Hetherington K., Holm L., Mistry J., Sonnhammer E.L.L., Tate J., and Punta M. Pfam: The protein families database // *Nucleic Acids Res.*, 2014, vol. 42, no. D1, pp. 222–230, doi: 10.1093/nar/gkt1223.
 41. Forterre P. A new fusion hypothesis for the origin of *Eukarya*: Better than previous ones, but probably also wrong // *Res. Microbiol.*, 2011, vol. 162, no. 1, pp. 77–91, doi: 10.1016/j.resmic.2010.10.005.
 42. Franzmann P.D. and Skerman V.B., *Gemmata obscuriglobus*, a new genus and species of the budding bacteria // *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1984, vol. 50, no. 3, pp. 261–268, doi: 10.1007/BF02342136.

43. Fredrik H. and Torbjorn N. Molecular modelling of lipase catalysed reactions prediction of enantioselectivities // *Chem. Pharm. Bull.*, 1999, vol. 47, no. 5, pp. 591–600.
44. Frey J.C., Rothman J.M., Pell A.N., Nizeyi J.B., Cranfield M.R., and Angert E.R. Fecal bacterial diversity in a wild gorilla // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 5, pp. 3788–3792, doi: 10.1128/AEM.72.5.3788-3792.2006.
45. Fries M., Ihrig J., Brocklehurst K., Shevchik V.E., and Pickersgill R.W. Molecular basis of the activity of the phytopathogen pectin methylesterase // *EMBO J.*, 2007, vol. 26, no. 17, pp. 3879–3887, doi: 10.1038/sj.emboj.7601816.
46. Fuerst J.A. and Sagulenko E. Beyond the bacterium: Planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function // *Nat Rev Microbiol*, 2011, vol. 9, no. 6, pp. 403–413, doi: 10.1038/nrmicro2578.
47. Fukunaga Y., Kurahashi M., Sakiyama Y., Ohuchi M., Yokota A., and Harayama S. *Phycisphaera mikurensis* gen. nov., sp nov., isolated from a marine alga, and proposal of *Phycisphaeraceae* fam. nov., *Phycisphaerales* ord. nov and *Phycisphaerae* classis nov in the phylum *Planctomycetes* // *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2009, vol. 55, no. 4, pp. 267–275, doi: 10.2323/jgam.55.267.
48. Gacesa P. Alginate-modifying enzymes: A proposed unified mechanism of action for the lyases and epimerases // *FEBS Lett.*, 1987, vol. 212, no. 2, pp. 199–202.
49. Gade D., Theiss D., Lange D., Mirgorodskaya E., Lombardot T., Glöckner F.O., Kube M., Reinhardt R., Amann R., Lehrach H., Rabus R., and Gobom J. Towards the proteome of the marine bacterium *Rhodopirellula baltica*: Mapping the soluble proteins // *Proteomics*, 2005, vol. 5, no. 14, pp. 3654–3671, doi: 10.1002/pmic.200401201.
50. Galperin M.Y., Makarova K.S., Wolf Y.I., and Koonin E.V. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database // *Nucleic Acids Res.*, 2015, vol. 43, no. D1, pp. D261–D269, doi: 10.1093/nar/gku1223.
51. Garron M.L. and Cygler M. Structural and mechanistic classification of uronic acid-containing polysaccharide lyases // *Glycobiology*, 2010, vol. 20, no. 12, pp. 1547–1573, doi: 10.1093/glycob/cwq122.
52. Gaurav K., Kumar D., Jagadeeshwari U., Shabbir A., Sasikala C., and Ramana C.V. Phylo-taxogenomics of the genus *Tautonia* with descriptions of *Tautonia marina* sp. nov., *Tautonia rosea* sp. nov., and emended description of the genus // *Syst. Appl. Microbiol.*, 2021, vol. 44, no. 4, p. 126229, doi: 10.1016/j.syapm.2021.126229.
53. Gavrilov S.N., Stracke C., Jensen K., Menzel P., Kallnik V., Slesarev A., Sokolova T., Zayulina K., Bräsen C., Bonch-Osmolovskaya E.A., Peng X., Kublanov I.V., and Siebers B. Isolation and characterization of the first xylanolytic hyperthermophilic euryarchaeon *Thermococcus* sp.

- strain 2319x1 and its unusual multidomain glycosidase // *Front. Microbiol.*, 2016, vol. 7, no. 552, pp. 1–17, doi: 10.3389/fmicb.2016.00552.
54. Giovannoni S.J., Schabtach E., and Castenholtz R.W. *Isosphaera pallida*, gen. and comb. nov., a gliding, budding eubacterium from hot springs // *Arch. Microbiol.*, 1987, vol. 147, pp. 276–284, doi: 10.3747/pdi.2011.00058.
 55. Glöckner F.O., Kube M., Bauer M., Teeling H., Lombardot T., Ludwig W., Gade D., Beck A., Borzym K., Heitmann K., Rabus R., Schlesner H., Amann R., and Reinhardt R. Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2003, vol. 100, no. 14, pp. 8298–8303, doi: 10.1073/pnas.1431443100.
 56. Glöckner J., Kube M., Shrestha P.M., Weber M., Glöckner F.O., Reinhardt R., and Liesack W. Phylogenetic diversity and metagenomics of candidate division OP3 // *Environ. Microbiol.*, 2010, vol. 12, no. 5, pp. 1218–1229, doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02164.x.
 57. Godinho O., Botelho R., Albuquerque L., Wiegand S., Kallscheuer N., da Costa M.S., Lobo-da-Cunha A., Jogler C., and Lage O.M. *Bremerella alba* sp. nov., a novel planctomycete isolated from the surface of the macroalga *Fucus spiralis* // *Syst. Appl. Microbiol.*, 2021, vol. 44, no. 3, doi: 10.1016/j.syapm.2021.126189.
 58. Gordon D., Abajian C., and Green P. Consed: A graphical tool for sequence finishing // *Genome Res.*, 1998, vol. 8, no. 3, pp. 195–202, doi: 10.1101/gr.8.3.195.
 59. Graca A.P., Calisto R., and Lage O.M. Planctomycetes as novel source of bioactive molecules // *Front. Microbiol.*, 2016, vol. 7, no. AUG, doi: 10.3389/fmicb.2016.01241.
 60. Hancock S.M. and Withers S.G. Glycosidases: Functions, Families and Folds // *eLS*, 2007, doi: 10.1002/9780470015902.a0020548.pub2.
 61. Hashimoto W., Miki H., Tsuchiya N., Nankai H., and Murata K. Xanthan lyase of *Bacillus* sp. strain GL1 liberates pyruvylated mannose from xanthan side chains // *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, vol. 64, no. 10, pp. 3765–3768.
 62. Hehemann J.H., Correc G., Barbeyron T., Helbert W., Czjzek M., and Michel G. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota // *Nature*, 2010, vol. 464, no. 7290, pp. 908–912, doi: 10.1038/nature08937.
 63. Henrissat B. and Davies G. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases // *Curr. Biol.*, 1995, vol. 3, no. 9, pp. 853–859.
 64. Henrissat B. Glycosyl hydrolases from hyperthermophiles // *Biochem. J.*, 1991, vol. 280, pp. 309–316, doi: 10.1007/s007920050009.
 65. Hirsch P. and Müller M. *Planctomyces limnophilus* sp. nov., a stalked and budding bacterium from freshwater // *Syst. Appl. Microbiol.*, 1985, vol. 6, no. 3, pp. 276–280, doi: 10.1016/S0723-2020(85)80031-X.

66. Hirsch P. Two identical genera of budding and stalked bacteria: *Planctomyces Gimesi* 1924 and *Blastocaulis Henrici* and Johnson 1935 // *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1972, vol. 22, no. 2, pp. 107–111, doi: 10.1099/00207713-22-2-107.
67. Ho K.K. and Weiner H. Isolation and characterization of an aldehyde dehydrogenase encoded by the *aldB* gene of *Escherichia coli* isolation and characterization of an aldehyde dehydrogenase encoded by the *aldB* gene of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.*, 2005, vol. 187, no. 3, pp. 1067–1073, doi: 10.1128/JB.187.3.1067.
68. Hugenholtz P., Pitulle C., Hershberger K.L., and Pace N.R. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring // *J. Bacteriol.*, 1998, vol. 180, no. 2, pp. 366–376.
69. Ivanova A.A., Kulichevskaya I.S., Merkel A.Y., Toshchakov S.V., and Dedysh S.N. High diversity of planctomycetes in soils of two lichen-dominated sub-arctic ecosystems of Northwestern Siberia // *Front. Microbiol.*, 2016, vol. 7, no. 2065, pp. 1–13, doi: 10.3389/fmicb.2016.02065.
70. Ivanova A.A., Naumoff D.G., Miroshnikov K.K., Liesack W., and Dedysh S.N. Comparative genomics of four *Isosphaeraceae* planctomycetes: a common pool of plasmids and glycoside hydrolase genes shared by *Paludisphaera borealis* PX4T, *Isosphaera pallida* IS1BT, *Singulisphaera acidiphila* DSM 18658T, and strain SH-PL62 // *Front. Microbiol.*, 2017, vol. 8, no. March, pp. 1–14, doi: 10.3389/fmicb.2017.00412.
71. Ivanova A.A., Wegner C.E., Kim Y., Liesack W., and Dedysh S.N. Metatranscriptomics reveals the hydrolytic potential of peat-inhabiting *Planctomycetes* // *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2018, vol. 111, no. 6, pp. 801–809, doi: 10.1007/s10482-017-0973-9.
72. Ivanova A.A. and Dedysh S.N. Abundance, diversity, and depth distribution of *Planctomycetes* in acidic northern wetlands // *Front. Microbiol.*, 2012, vol. 3, no. JAN, pp. 1–9, doi: 10.3389/fmicb.2012.00005.
73. Jarett J.K., MacManes M.D., Morrow K.M., Pankey M.S., and Lesser M.P. Comparative genomics of color morphs in the coral *Montastraea cavernosa* // *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, doi: 10.1038/s41598-017-16371-9.
74. Jeske O., Jogler M., Petersen J., Sikorski J., and Jogler C. From genome mining to phenotypic microarrays: *Planctomycetes* as source for novel bioactive molecules // *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, vol. 104, no. 4, pp. 551–567, doi: 10.1007/s10482-013-0007-1.
75. Jeske O., Schüler M., Schumann P., Schneider A., Boedeker C., Jogler M., Bollschweiler D., Rohde M., Mayer C., Engelhardt H., Spring S., and Jogler C. Planctomycetes do possess a peptidoglycan cell wall // *Nat Commun*, 2015, vol. 6, no. May, p. 7116, doi: 10.1038/ncomms8116.

76. Jeske O., Surup F., Ketteniss M., Rast P., Forster B., Jogler M., Wink J., and Jogler C. Developing techniques for the utilization of planctomycetes as producers of bioactive molecules // *Front. Microbiol.*, 2016, vol. 7, no. AUG, pp. 1–14, doi: 10.3389/fmicb.2016.01242.
77. Jogler C., Waldmann J., Huang X., Jogler M., Glöckner F.O., Mascher T., and Kolter R. Identification of proteins likely to be involved in morphogenesis, cell division, and signal transduction in Planctomycetes by comparative genomics // *J. Bacteriol.*, 2012, vol. 194, no. 23, pp. 6419–6430, doi: 10.1128/jb.01325-12.
78. Jörnvall H., Persson B., Krook M., Atrian S., González-Duarte R., Jeffery J., and Ghosh D. Short-chain dehydrogenases/reductases(SDR) // *Biochemistry*, 1995, vol. 34, no. 18, pp. 6003–13, doi: 10.1021/bi00018a001.
79. Kallscheuer N., Jeske O., Sandargo B., Boedeker C., Wiegand S., Bartling P., Jogler M., Rohde M., Petersen J., Medema M.H., Surup F., and Jogler C. The planctomycete *Stieleria maiorica* Mal15T employs stieleriacines to alter the species composition in marine biofilms // *Commun. Biol.*, 2020, vol. 3, no. 1, pp. 1–8, doi: 10.1038/s42003-020-0993-2.
80. Kallscheuer N., Jogler C., Peeters S.H., Boedeker C., Jogler M., Heuer A., Jetten M.S.M., Rohde M., and Wiegand S. *Mucisphaera calidilacus* gen. nov., sp. nov., a novel planctomycete of the class *Phycisphaerae* isolated in the shallow sea hydrothermal system of the Lipari Islands // *Antonie van Leeuwenhoek*, 2022, vol. 115, no. 3, pp. 407–420, doi: 10.1007/s10482-021-01707-3.
81. Kallscheuer N., Wiegand S., Kohn T., Boedeker C., Jeske O., Rast P., Müller R.W., Brümmer F., Heuer A., Jetten M.S.M., Rohde M., Jogler M., and Jogler C. Cultivation-independent analysis of the bacterial community associated with the calcareous sponge *Clathrina clathrus* and isolation of *Poriferisphaera corsica* gen. nov., sp. nov., belonging to the barely studied class *Phycisphaerae* in the phylum *Planctomycetes* // *Front. Microbiol.*, 2020b, vol. 11, no. December, pp. 1–10, doi: 10.3389/fmicb.2020.602250.
82. Kartal B., De Almeida N.M., Maalcke W.J., Op den Camp H.J.M., Jetten M.S.M., and Keltjens J.T. How to make a living from anaerobic ammonium oxidation // *FEMS Microbiol. Rev.*, 2013, vol. 37, no. 3, pp. 428–461, doi: 10.1111/1574-6976.12014.
83. Kartal B., Kuenen J.G., and Van Loosdrecht M.C.M. Sewage treatment with anammox // *Science*, 2010, vol. 328, no. 5979, pp. 702–703, doi: 10.1126/science.1185941.
84. Katoh K., Rozewicki J., and Yamada K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization // *Brief. Bioinform.*, 2017, no. December, pp. 1–7, doi: 10.1093/bib/bbx108.

85. Kaushik R., Sharma M., Gaurav K., Jagadeeshwari U., Shabbir A., Sasikala C., Ramana C.V., and Pandit M.K. *Paludisphaera soli* sp. nov., a new member of the family *Isosphaeraceae* isolated from high altitude soil in the Western Himalaya // *Antonie van Leeuwenhoek*, 2020, vol. 113, no. 11, pp. 1663–1674, doi: 10.1007/s10482-020-01471-w.
86. Kellogg C.A., Ross S.W., and Brooke S.D. Bacterial community diversity of the deep-sea octocoral *Paramuricea placomus* // *PeerJ*, 2016, vol. 4, p. e2529, doi: 10.7717/peerj.2529.
87. Klimacek M., Kavanagh K.L., Wilson D.K., and Nidetzky B. *Pseudomonas fluorescens* mannitol 2-dehydrogenase and the family of polyol-specific long-chain dehydrogenases/reductases: Sequence-based classification and analysis of structure-function relationships // *Chem. Biol. Interact.*, 2003, vol. 143–144, pp. 559–582, doi: 10.1016/S0009-2797(02)00219-3.
88. Köhler T., Stingl U., Meuser K., and Brune A. Novel lineages of *Planctomycetes* densely colonize the alkaline gut of soil-feeding termites (*Cubitermes* spp.) // *Environ. Microbiol.*, 2008, vol. 10, no. 5, pp. 1260–1270, doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01540.x.
89. Kohn T., Heuer A., Jogler M., Vollmers J., and Boedeker C. *Fuerstia marisgermanicae* gen. nov., sp. nov., an unusual member of the phylum *Planctomycetes* from the German Wadden Sea // *Front. Microbiol.*, 2016, vol. 7, no. 2079, pp. 1–15, doi: 10.3389/fmicb.2016.02079.
90. Kohn T., Rast P., Kallscheuer N., Wiegand S., Boedeker C., Jetten M.S.M., Jeske O., Vollmers J., Kaster A.K., Rohde M., Jogler M., and Jogler C. The microbiome of *Posidonia oceanica* seagrass leaves can be dominated by *Planctomycetes* // *Front. Microbiol.*, 2020, vol. 11, no. July, doi: 10.3389/fmicb.2020.01458.
91. Koshland Jr., D. E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions // *Biol. Rev.*, 1953, vol. 28, no. February, pp. 416–436.
92. Kovaleva O.L., Merkel A.Y., Novikov A.A., Baslerov R.V., Toshchakov S.V., and Bonch-Osmolovskaya E.A. *Tepidisphaera mucosa* gen. Nov., sp. nov., a moderately thermophilic member of the class *Phycisphaerae* in the phylum *Planctomycetes*, and proposal of a new family, *Tepidisphaeraceae* fam. nov., and a new order, *Tepidisphaerales* ord. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2015, vol. 65, no. 2, pp. 549–555, doi: 10.1099/ijs.0.070151-0.
93. Krogh A., Larsson B., von Heijne G., and Sonnhammer E.L.L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes // *J. Mol. Biol.*, 2001, vol. 305, no. 3, pp. 567–580, doi: 10.1006/jmbi.2000.4315.
94. Kulichevskaya I.S., Baulina O.I., Bodelier P.L.E., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damsté J.S., and Dedysh S.N. *Zavarzinella formosa* gen. nov., sp. nov., a novel stalked, *Gemmata*-like planctomycete from a Siberian peat bog // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2009, vol. 59, no. 2, pp. 357–364, doi: 10.1099/ijs.0.002378-0.

95. Kulichevskaya I.S., Detkova E.N., Bodelier P.L.E., Rijpstra W.I.C., Damste J.S.S., and Dedysh S.N. *Singulisphaera rosea* sp. nov., a planctomycete from acidic sphagnum peat, and emended description of the genus *Singulisphaera* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2012a, vol. 62, no. 1, pp. 118–123, doi: 10.1099/ijms.0.025924-0.
96. Kulichevskaya I.S., Ivanova A.A., Baulina O.I., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damsté J.S., and Dedysh S.N. *Fimbrioglobus ruber* gen. Nov., sp. nov., a *Gemmata*-like planctomycete from Sphagnum peat bog and the proposal of *Gemmataceae* fam. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2017a, vol. 67, no. 2, pp. 218–224, doi: 10.1099/ijsem.0.001598.
97. Kulichevskaya I.S., Ivanova A.A., Detkova E.N., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damsté J.S., and Dedysh S.N. *Planctomicrobium piriforme* gen. nov., sp. nov., a stalked planctomycete from a littoral wetland of a boreal lake // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2015, vol. 65, no. 5, pp. 1659–1665, doi: 10.1099/ijms.0.000154.
98. Kulichevskaya I.S., Ivanova A.A., Detkova E.N., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damsté J.S., and Dedysh S.N. *Tundrisphaera lichenicola* gen. nov., sp. nov., a psychrotolerant representative of the family *Isosphaeraceae* from lichen-dominated tundra soils // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2017b, vol. 67, no. 9, pp. 3583–3589.
99. Kulichevskaya I.S., Ivanova A.A., Naumoff D.G., Beletsky A.V., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damsté J.S., Mardanov A.V., Ravin N.V., and Dedysh S.N. *Frigoriglobus tundricola* gen. nov., sp. nov., a psychrotolerant cellulolytic planctomycete of the family *Gemmataceae* from a littoral tundra wetland // *Syst. Appl. Microbiol.*, 2020a, vol. 43, no. 5, doi: 10.1016/j.syapm.2020.126129.
100. Kulichevskaya I.S., Ivanova A.A., Suzina N.E., Rijpstra W.I.C., Damsté J.S.S., and Dedysh S.N. *Paludisphaera borealis* gen. nov., sp. nov., a hydrolytic planctomycete from northern wetlands, and proposal of *Isosphaeraceae* fam. Nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2016, vol. 66, no. 2, pp. 837–844, doi: 10.1099/ijsem.0.000799.
101. Kulichevskaya I.S., Ivanova A.A., Baulina O.I., Bodelier P.L.E., Damsté J.S.S., and Dedysh S.N. *Singulisphaera acidiphila* gen. nov., sp. nov., a non-filamentous, *Isosphaera*-like planctomycete from acidic northern wetlands // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2008, vol. 58, no. 5, pp. 1186–1193, doi: 10.1099/ijms.0.65593-0.
102. Kulichevskaya I.S., Ivanova A.A., Belova S.E., Baulina O.I., Bodelier P.L.E., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damsté J.S., Zavarzin G.A., and Dedysh S.N. *Schlesneria paludicolagen.* nov., sp. nov., the first acidophilic member of the order *Planctomycetales*, from sphagnum-dominated boreal wetlands // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007, vol. 57, no. 11, pp. 2680–2687, doi: 10.1099/ijms.0.65157-0.

103. Kulichevskaya I.S., Naumoff D.G., Miroschnikov K.K., Ivanova A.A., Philippov D.A., Hakobyan A., Rijpstra W.I.C., Damsté J.S.S., Liesack W., and Dedysh S.N. *Limnoglobus roseus* gen. nov., sp. nov., a novel freshwater planctomycete with a giant genome from the family *Gemmataceae* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2020b, vol. 70, no. 2, pp. 1240–1249, doi: 10.1099/ijsem.0.003904.
104. Kulichevskaya I.S., Serkebaeva Y.M., Kim Y., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damsté J.S., Liesack W., and Dedysh S.N. *Telmatocola sphagniphila* gen. nov., sp. nov., a novel dendriform planctomycete from northern wetlands // *Front. Microbiol.*, 2012b, vol. 3, no. 146, pp. 1–9, doi: 10.3389/fmicb.2012.00146.
105. Kumar D., Gaurav K., Jagadeeshwari U., Deepshikha G., Sasikala C., and Ramana C.V., *Roseimaritima sediminicola* sp. nov., a new member of *Planctomycetaceae* isolated from chilika lagoon // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2020a, vol. 70, no. 4, pp. 2616–2623, doi: 10.1099/ijsem.0.004076.
106. Kumar D., Gaurav K., Sreya P.K., Shabbir A., Uppada J., Sasikala C., and Ramana C.V. *Gimesia chilikensis* sp. Nov., a haloalkali-tolerant planctomycete isolated from Chilika lagoon and emended description of the genus *Gimesia* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2020b, vol. 70, no. 6, pp. 3647–3655, doi: 10.1099/ijsem.0.004211.
107. Kumar D., Kumar G., Uppada J., Ahmed S., Sasikala C., and Ramana C.V. Descriptions of *Roseiconus nitratreducens* gen. nov. sp. nov. and *Roseiconus lacunae* sp. nov. // *Arch. Microbiol.*, 2021, vol. 203, no. 2, pp. 741–754, doi: 10.1007/s00203-020-02078-5.
108. Kumar S., Stecher G., and Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // *Mol. Biol. Evol.*, 2016, vol. 33, no. 7, pp. 1870–1874, doi: 10.1093/molbev/msw054.
109. Lage O.M., Albuquerque L., Lobo-da Cunha A., and da Costa M.S. *Mariniblastus fucicola* gen. nov., sp. nov. a novel planctomycete associated with macroalgae // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2017, vol. 67, no. 5, pp. 1571–1576, doi: 10.1099/ijsem.0.001760.
110. Lau M.C.Y., Aitchison J.C., and Pointing S.B. Bacterial community composition in thermophilic microbial mats from five hot springs in central Tibet // *Extremophiles*, 2009, vol. 13, no. 1, pp. 139–149, doi: 10.1007/s00792-008-0205-3.
111. Lee H.W., Roh S.W., Shin N.R., Lee J., Whon T.W., Jung M.J., Yun J.H., Kim M.S., Hyun D.W., Kim D., and Bae J.W. *Blastopirellula cremea* sp. nov., isolated from a dead ark clam // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2013, vol. 63, pp. 2314–2319, doi: 10.1099/ijse.0.044099-0.
112. Leser T.D., Amenuvor J.Z., Jensen T.K., Lindecrona R.H., Boye M., and Møller K. Culture-independent analysis of gut bacteria: The pig gastrointestinal tract microbiota revisited // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, vol. 68, no. 2, pp. 673–690, doi: 10.1128/AEM.68.2.673-690.2002.

113. Li B., Guo J., Chen W., Chen X., Chen L., Liu Z., and Li X. Endoxanthanase, a novel β -D-Glucanase hydrolyzing backbone linkage of intact xanthan from newly isolated microbacterium sp. XT11 // *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2009a, vol. 159, no. 1, pp. 24–32, doi: 10.1007/s12010-008-8439-1.
114. Li D., Sharp J.O., and Drewes J.E. Influence of wastewater discharge on the metabolic potential of the microbial community in river sediments // *Microb. Ecol.*, 2016a, vol. 71, no. 1, pp. 78–86, doi: 10.1007/s00248-015-0680-x.
115. Li H. and Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform // *Bioinformatics*, 2009b, vol. 25, no. 14, pp. 1754–1760, doi: 10.1093/bioinformatics/btp324.
116. Li M., Jain S., and Dick G.J. Genomic and transcriptomic resolution of organic matter utilization among deep-sea bacteria in guaymas basin hydrothermal plumes // *Front. Microbiol.*, 2016b, vol. 7, no. JUL, pp. 1–13, doi: 10.3389/fmicb.2016.01125.
117. Li X.M., Zhu Y.J., Yan Q.Y., Ringø E., and Yang D.G. Do the intestinal microbiotas differ between paddlefish (*Polyodon spathala*) and bighead carp (*Aristichthys nobilis*) reared in the same pond // *J. Appl. Microbiol.*, 2014, vol. 117, no. 5, pp. 1245–1252, doi: 10.1111/jam.12626.
118. Liao Y., Smyth G.K., and Shi W. The Subread aligner: Fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote // *Nucleic Acids Res.*, 2013, vol. 41, no. 10, doi: 10.1093/nar/gkt214.
119. Liesack W., König H., Schlesner H., and Hirsch P. Chemical composition of the peptidoglycan-free cell envelopes of budding bacteria of the Pirella/Planctomyces group // *Arch. Microbiol.*, 1986, vol. 145, no. 4, pp. 361–366, doi: 10.1007/BF00470872.
120. Lindsay M.R., Webb R.I., Strous M., Jetten M.S.M., Butler M.K., Forde R.J., and Fuerst J.A. Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell // *Arch. Microbiol.*, 2001, vol. 175, no. 6, pp. 413–429, doi: 10.1007/s002030100280.
121. Lombard V., Bernard T., Rancurel C., Brumer H., Coutinho P.M., and Henrissat B. A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics // *Biochem. J.*, 2010, vol. 432, no. 3, pp. 437–444, doi: 10.1042/bj20101185.
122. Lombard V., Golaconda Ramulu H., Drula E., Coutinho P.M., and Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013 // *Nucleic Acids Res.*, 2014, vol. 42, pp. D490–D495, doi: 10.1093/nar/gkt1178.
123. Lonhienne T.G., Sagulenko E., Webb R.I., Lee K.C., Franke J., Devos D.P., Nouwens A., Carroll B.J., and Fuerst J.A. Endocytosis-like protein uptake in the bacterium *Gemmata obscuriglobus* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, vol. 107, no. 29, pp. 12883–12888, doi: 1001085107 [pii]r10.1073/pnas.1001085107.

124. López-Pérez M., Kimes N.E., Haro-Moreno J.M., and Rodriguez-Valera F. Not all particles are equal: The selective enrichment of particle-associated bacteria from the mediterranean sea // *Front. Microbiol.*, 2016, vol. 7, no. 996, pp. 1–15, doi: 10.3389/fmicb.2016.00996.
125. Luo C., Rodriguez-R L.M., and Konstantinidis K.T. MyTaxa: An advanced taxonomic classifier for genomic and metagenomic sequences // *Nucleic Acids Res.*, 2014, vol. 42, no. 8, p. e73, doi: 10.1093/nar/gku169.
126. Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., Berka J., Braverman M.S., Chen Y., Chen Z., Dewell B., Du L., Fierro J.M., Gomes X.V, Goodwin B.C., He W., *et al.* Genome sequencing in open microfabricated high density picoliter reactors // *Nat. Biotechnol.*, 2005, vol. 437, no. 7057, pp. 376–380, doi: 10.1038/nature03959.Copyright.
127. Mccarter J.D. and Withers S.G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis // *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1994, vol. 4, pp. 885–892, doi: 10.1016/0959-440X(94)90271-2.
128. Mcinerney J.O., Martin W.F., Koonin E.V., Allen J.F., Galperin M.Y., Lane N., Archibald J.M., and Embley T.M. Planctomycetes and eukaryotes: A case of analogy not homology // *BioEssays*, 2011, vol. 33, no. 11, pp. 810–817, doi: 10.1002/bies.201100045.
129. Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.P., and Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // *BMC Bioinformatics*, 2013, vol. 14, no. 60, pp. 2–14, doi: 10.1186/1471-2105-14-60.
130. Merceron R., Foucault M., Haser R., Mattes R., Watzlawick H., and Gouet P. The molecular mechanism of thermostable α -galactosidases AgaA and AgaB explained by x-ray crystallography and mutational studies // *J. Biol. Chem.*, 2012, vol. 287, no. 47, pp. 39642–39652, doi: 10.1074/jbc.M112.394114.
131. Morris R.M., Longnecker K., and Giovannoni S.J. *Pirellula* and OM43 are among the dominant lineages identified in an Oregon coast diatom bloom // *Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 8, no. 8, pp. 1361–1370, doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01029.x.
132. Musfeldt M. and Schönheit P. Novel type of ADP-forming acetyl coenzyme A synthetase in hyperthermophilic *Archaea*: heterologous expression and characterization of isoenzymes from the sulfate reducer *Archaeoglobus fulgidus* and the methanogen *Methanococcus jannaschii* // *J. Bacteriol.*, 2002, vol. 184, no. 3, pp. 636–644, doi: 10.1128/JB.184.3.636.
133. Niu J., Chao J., Xiao Y., Chen W., Zhang C., Liu X., Rang Z., Yin H., and Dai L. Insight into the effects of different cropping systems on soil bacterial community and tobacco bacterial wilt rate // *J. Basic Microbiol.*, 2017, vol. 57, no. 1, pp. 3–11, doi: 10.1002/jobm.201600222.
134. Park D. Genomic DNA isolation from different biological materials // In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 353, 2007, pp. 3–13, doi: 10.1385/1-59745-229-7:3.

135. Parks D.H., Chuvochina M., Waite D.W., Rinke C., Skarszewski A., Chaumeil P.-A., and Hugenholtz P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life // *Nat. Biotechnol.*, 2018, vol. 36, no. 10, pp. 996–1004, <https://doi.org/10.1038/nbt.4229>
136. Parks D.H., Rinke C., Chuvochina M., Chaumeil P.A., Woodcroft B.J., Evans P.N., Hugenholtz P., and Tyson G.W. Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life // *Nat. Microbiol.*, 2017, vol. 2, no. 11, pp. 1533–1542, doi: 10.1038/s41564-017-0083-5.
137. Pearson A., Budin M., and Brocks J.J. Phylogenetic and biochemical evidence for sterol synthesis in the bacterium *Gemmata obscuriglobus* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2003, vol. 100, no. 26, pp. 15352–15357, doi: 10.1073/pnas.2536559100.
138. Petersen T.N., Brunak S., von Heijne G., and Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions // *Nat. Methods*, 2011, vol. 8, no. 10, pp. 785–6, doi: 10.1038/nmeth.1701.
139. Pilhofer M., Rappl K., Eckl C., Bauer A.P., Ludwig W., Schleifer K.H., and Petroni G. Characterization and evolution of cell division and cell wall synthesis genes in the bacterial phyla *Verrucomicrobia*, *Lentisphaerae*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes* and phylogenetic comparison with rRNA genes // *J. Bacteriol.*, 2008, vol. 190, no. 9, pp. 3192–3202, doi: 10.1128/JB.01797-07.
140. Portillo M.C., Sririn V., Kanoksilapatham W., and Gonzalez J.M. Differential microbial communities in hot spring mats from Western Thailand // *Extremophiles*, 2009, vol. 13, no. 2, pp. 321–331, doi: 10.1007/s00792-008-0219-x.
141. Pradel N., Fardeau M.L., Tindall B.J., and Spring S. *Anaerohalosphaera lusitana* gen. nov., sp. nov., and *Limihaloglobus sulfuriphilus* gen. nov., sp. nov., isolated from solar saltern sediments, and proposal of *Anaerohalosphaeraceae* fam. nov. within the order *Sedimentisphaerales* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2020, vol. 70, no. 2, pp. 1321–1330, doi: 10.1099/ijsem.0.003919.
142. Prazeres M., Ainsworth T., Roberts T.E., Pandolfi J.M., and Leggat W. Symbiosis and microbiome flexibility in calcifying benthic foraminifera of the great Barrier Reef // *Microbiome*, 2017, vol. 5, no. 1, pp. 1–11, doi: 10.1186/S40168-017-0257-7.
143. Pritchard L., Glover R.H., Humphris S., Elphinstone J.G., and Toth I.K. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: Soft-rotting enterobacterial plant pathogens // *Anal. Methods*, 2016, vol. 8, no. 1, pp. 12–24, doi: 10.1039/c5ay02550h.
144. Probandt D., Eickhorst T., Ellrott A., Amann R., and Knittel K. Microbial life on a sand grain: From bulk sediment to single grains // *ISME J.*, 2018, vol. 12, no. 2, pp. 623–633, doi: 10.1038/ismej.2017.197.

145. Qu Q., Lee S., and Boos W. TreT , a novel trehalose glycosyltransferring synthase of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* // *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, no. 46, pp. 47890–47897, doi: 10.1074/jbc.M404955200.
146. Quaiser A., Zivanovic Y., Moreira D., and López-García P. Comparative metagenomics of bathypelagic plankton and bottom sediment from the Sea of Marmara // *ISME J.*, 2011, vol. 5, no. 2, pp. 285–304, doi: 10.1038/ismej.2010.113.
147. Rakitin A.L., Naumoff D.G., Beletsky A.V., Kulichevskaya I.S., Mardanov A.V., Ravin N.V., and Dedysh S.N. Complete genome sequence of the cellulolytic planctomycete *Telmatocola sphagniphila* SP2T and characterization of the first cellulolytic enzyme from planctomycetes // *Syst. Appl. Microbiol.*, 2021, vol. 44, no. 6, p. 126276, doi: 10.1016/j.syapm.2021.126276.
148. Ravin N.V., Rakitin A.L., Ivanova A.A., Beletsky A.V., Kulichevskaya I.S., Mardanov A.V., and Dedysh S.N. Genome analysis of *Fimbrioglobus ruber* SP5 T , a planctomycete with confirmed chitinolytic capability // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2018, vol. 84, no. 7, pp. 1–12, doi: 10.1128/aem.02645-17.
149. Reshetnikov A.S., Rozova O.N., Khmelenina V.N., Mustakhimov I.I., Beschastny A.P., Murrell J.C., and Trotsenko Y.A. Characterization of the pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase from *Methylococcus capsulatus* Bath // *FEMS Microbiol. Lett.*, 2008, vol. 288, no. 2, pp. 202–210, doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01366.x.
150. Rivas-marín E., Canosa I., and Devos D.P. Evolutionary cell biology of division mode in the bacterial *Planctomycetes* - *Verrucomicrobia* - *Chlamydiae* superphylum // *Front. Microbiol.*, 2016, vol. 7, no. 1964, pp. 1–11, doi: 10.3389/fmicb.2016.01964.
151. Rodionova I.A., Scott D.A., Grishin N.V., Osterman A.L., and Rodionov D.A. Tagaturonate-fructuronate epimerase UxaE, a novel enzyme in the hexuronate catabolic network in *Thermotoga maritime* // *Environ. Microbiol.*, 2012, vol. 14, no. 11, pp. 2920–2934, doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02856.x.
152. Roh S.W., Lee H.W., Yim K.J., Shin N.R., Lee J., Whon T.W., Lim N.L., Kim D., and Bae J.W. *Rhodopirellula rosea* sp. nov., a novel bacterium isolated from an ark clam *Scapharca broughtonii* // *J. Microbiol.*, 2013, vol. 51, no. 3, pp. 301–304, doi: 10.1007/s12275-013-3210-x.
153. Ruijsenaars H.J., De Bont J.A.M., and Hartmans S. A pyruvated mannose-specific xanthan lyase involved in xanthan degradation by *Paenibacillus alginolyticus* XL-1 // *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, vol. 65, no. 6, pp. 2446–2452.
154. Ryu S., Park C., Cha J., Woo E., and Lee S. A novel trehalose-synthesizing glycosyltransferase from *Pyrococcus horikoshii* : molecular cloning and characterization // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, vol. 329, pp. 429–436, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.01.149.

155. Santarella-Mellwig R., Franke J., Jaedicke A., Gorjanacz M., Bauer U., Budd A., Mattaj I.W., and Devos D.P. The compartmentalized bacteria of the *Planctomycetes-Verrucomicrobia-Chlamydiae* superphylum have membrane coat-like proteins // *PLoS Biol.*, 2010, vol. 8, no. 1, doi: 10.1371/journal.pbio.1000281.
156. Santarella-Mellwig R., Pruggnaller S., Roos N., Mattaj I. W., and Devos D.P. Three-dimensional reconstruction of bacteria with a complex endomembrane system // *PLoS Biol.*, 2013, vol. 11, no. 5, doi: 10.1371/journal.pbio.1001565.
157. Santos-Júnior C.D., Kishi L.T., Toyama D., Soares-Costa A., Oliveira T.C.S., de Miranda F.P., and Henrique-Silva F. Metagenome sequencing of prokaryotic microbiota collected from rivers in the upper Amazon basin // *Genome Announc.*, 2017, vol. 5, no. 2, pp. 1–2, doi: 10.1128/genomea.01450-16.
158. Satinsky B.M., Fortunato C.S., Doherty M., Smith C.B., Sharma S., Ward N.D., Krusche A.V., Yager P.L., Richey J.E., Moran M.A., and Crump B.C. Metagenomic and metatranscriptomic inventories of the lower Amazon River, May 2011 // *Microbiome*, 2015, vol. 3, p. 39, doi: 10.1186/s40168-015-0099-0.
159. Sayer C., Isupov M.N., Bonch-Osmolovskaya E., and Littlechild J.A. Structural studies of a thermophilic esterase from a new Planctomycetes species, *Thermogutta terrifontis* // *FEBS J.*, 2015, vol. 282, no. 15, pp. 2846–2857, doi: 10.1111/febs.13326.
160. Schellenberg J.J., Verbeke T.J., McQueen P., Krokhin O.V, Zhang X., Alvare G. Fristensky B., Thallinger G.G., Henrissat B., Wilkins J.A., Levin D.B., and Sparling R. Enhanced whole genome sequence and annotation of *Clostridium stercorarium* DSM8532T using RNA-seq transcriptomics and high-throughput proteomics // *BMC Genomics*, 2014, vol. 15, no. 1, p. 567, doi: 10.1186/1471-2164-15-567.
161. Schellenberger S., Kolb S., and Drake H.L. Metabolic responses of novel cellulolytic and saccharolytic agricultural soil Bacteria to oxygen // *Environ. Microbiol.*, 2010, vol. 12, no. 4, pp. 845–861, doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02128.x.
162. Scheuner C., Tindall B.J., Lu M., Nolan M., Lapidus A., Cheng J.-F., Goodwin L., Pitluck S., Huntemann M., Liolios K., Pagani I., Mavromatis K., Ivanova N., Pati A., Chen A., Palaniappan K., *et al.* Complete genome sequence of *Planctomyces brasiliensis* type strain (DSM 5305T), phylogenomic analysis and reclassification of *Planctomycetes* including the descriptions of *Gimesia* gen. nov., *Planctopirus* gen. nov. and // *Stand. Genomic Sci.*, 2014, vol. 9, no. 10, pp. 1–18, doi: 10.1186/1944-3277-9-10.
163. Schlesner H. and Hirsch P. Assignment of ATCC-27377 to *Pirella* gen. nov. as *Pirella staleyi* comb. nov. // *Int J Syst Bacteriol*, 1984, vol. 34, no. 4, pp. 492–495, doi: 10.1099/00207713-34-4-492.

164. Schlesner H. and Stackebrandt E. Assignment of the genera *Planctomyces* and *Pirella* to a new family *Planctomycetaceae* fam. nov. and description of the order *Planctomycetales* ord. nov. // *Syst. Appl. Microbiol.*, 1986, vol. 8, no. 3, pp. 174–176, doi: 10.1016/S0723-2020(86)80072-8.
165. Schlesner H. *Pirella marina* sp. nov., a budding, peptidoglycan-less bacterium from brackish water // *Syst. Appl. Microbiol.*, 1986, vol. 8, no. 3, pp. 177–180, doi: 10.1016/S0723-2020(86)80073-X.
166. Schlesner H. *Planctomyces brasiliensis* sp. nov., a halotolerant bacterium from a Salt Pit // *Syst. Appl. Microbiol.*, 1989, vol. 12, no. 2, pp. 159–161, doi: 10.1016/S0723-2020(89)80008-6.
167. Schlesner H., Rensmann C., Tindall B.J., Gade D., Rabus R., Pfeiffer S., and Hirsch P. Taxonomic heterogeneity within the *Planctomycetales* as derived by DNA–DNA hybridization, description of *Rhodopirellula baltica* gen. nov., sp. nov., transfer of *Pirellula marina* to the genus *Blastopirellula* gen. nov. as *Blastopirellula marina* comb. nov. an // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, vol. 54, no. 5, pp. 1567–1580, doi: 10.1099/ijms.0.63113-0.
168. Seeger C., Butler M.K., Yee B., Mahajan M., Fuerst J.A., and Andersson S.G.E. *Tuwongella immobilis* gen. nov., sp. nov., a novel non-motile bacterium within the phylum *Planctomycetes* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2017, vol. 67, no. 12, pp. 4923–4929, doi: 10.1099/ijsem.0.002271.
169. She S., Niu J., Zhang C., Xiao Y., Chen W., Dai L., Liu X., and Yin H. Significant relationship between soil bacterial community structure and incidence of bacterial wilt disease under continuous cropping system // *Arch. Microbiol.*, 2017, vol. 199, no. 2, pp. 267–275, doi: 10.1007/s00203-016-1301-x.
170. Simon J., Klotz M.G., and Nap N. Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations // *BBA - Bioenerg.*, 2013, vol. 1827, no. 2, pp. 114–135, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.07.005.
171. Sinnott M.L. Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer // *Chem. Rev.*, 1990, vol. 90, pp. 1171–1202, doi: 10.1021/cr00105a006.
172. Sipkema D., Holmes B., Nichols S.A., and Blanch H.W. Biological characterisation of *Haliclona* (gellius) sp.: sponge and associated microorganisms // *Microb. Ecol.*, 2009, vol. 58, no. 4, pp. 903–920, doi: 10.1007/s00248-009-9534-8.
173. Slobodkina G.B., Kovaleva O.L., Miroshnichenko M.L., Slobodkin A.I., Kolganova T.V., Novikov A.A., Van Heerden E., and Bonch-Osmolovskaya E.A. *Thermogutta terrifontis* gen. Nov., sp. nov. and *Thermogutta hypogea* sp. nov., thermophilic anaerobic representatives of the phylum *Planctomycetes* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2015, vol. 65, no. 3, pp. 760–765, doi: 10.1099/ijms.0.000009.

174. Slobodkina G.B., Panteleva A.N., Beskorovaynaya D.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., and Slobodkin A.I. *Thermostilla marina* gen. Nov., sp. nov., a thermophilic, facultatively anaerobic planctomycete isolated from a shallow submarine hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2016, vol. 66, no. 2, pp. 633–638, doi: 10.1099/ijsem.0.000767.
175. Spring S., Bunk B., Spröer C., Rohde M., and Klenk H.P. Genome biology of a novel lineage of planctomycetes widespread in anoxic aquatic environments // *Environ. Microbiol.*, 2018, vol. 20, no. 7, pp. 2438–2455, doi: 10.1111/1462-2920.14253.
176. Stackebrandt E., Ludwig W., Schubert W., Klink F., Schlesner H., Roggentin T., and Hirsch P. Molecular genetic evidence for early evolutionary origin of budding peptidoglycan-less eubacteria // *Nature*, 1984, vol. 307, no. 23, pp. 735–737.
177. Stamatakis A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies // *Bioinformatics*, 2014, vol. 30, no. 9, pp. 1312–1313, doi: 10.1093/bioinformatics/btu033.
178. Storesund J.E. and Øvreås L. Diversity of planctomycetes in iron-hydroxide deposits from the arctic mid ocean ridge (AMOR) and description of *Bythopirellula goksoyri* gen. nov., sp. nov., a novel Planctomycete from deep sea iron-hydroxide deposits // *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, vol. 104, no. 4, pp. 569–584, doi: 10.1007/s10482-013-0019-x.
179. Strous M., Pelletier E., Mangenot S., Rattei T., Lehner A., Taylor M.W., Fonknechten N., Horn M., Daims H., Bartol-mavel D., Wincker P., Schenowitz-truong C., Me C., Collingro A., Vallenet D., Snel B., *et al.* Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome // *Nature*, 2006, vol. 440, no. 6, pp. 790–794, doi: 10.1038/nature04647.
180. Susskind B.M., Warren L.G., and Reeves R.E. A pathway for the interconversion of hexose and pentose in the parasitic amoeba *Entamoeba histolytica* // *Biochem J*, 1982, vol. 204, no. 1, pp. 191–196.
181. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P., Zaslavsky L., Lomsadze A., Pruitt K.D., Borodovsky M., and Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // *Nucleic Acids Res.*, 2016, vol. 44, no. 14, pp. 6614–6624, doi: 10.1093/nar/gkw569.
182. Taylor E.J., Gloster T.M., Turkenburg J.P., Vincent F., Brzozowski A.M., Dupont C., Shareck F., Centeno M.S.J., Prates J.A.M., Puchart V., Ferreira L.M.A., Fontes C.M.G. A., Biely P., and Davies G.J. Structure and activity of two metal ion-dependent acetylxyylan esterases involved in plant cell wall degradation reveals a close similarity to peptidoglycan deacetylases // *J. Biol. Chem.*, 2006, vol. 281, no. 16, pp. 10968–10975, doi: 10.1074/jbc.M513066200.
183. Toth J., Ismaiel A.A., and Chen J.S. The ald gene, encoding a coenzyme A-acylating aldehyde dehydrogenase, distinguishes *Clostridium beijerinckii* and two other solvent-producing

- clostridia from *Clostridium acetobutylicum* // *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, vol. 65, no. 11, pp. 4973–4980.
184. van de Graaf A., de Bruijn P., Robertson L.A., Jetten M.S.M., and Kuenen J.G. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor // *Microbiol. (United Kingdom)*, 1996, vol. 142, pp. 2187–2189.
 185. van Niftrik L., Geerts W.J.C., van Donselaar E.G., Humbel B.M., Webb R.I., Harhangi H.R., Op den Camp H.J.M., Fuerst J.A., Verkleij A.J., Jetten M.S.M., and Strous M. Cell division ring, a new cell division protein and vertical inheritance of a bacterial organelle in anammox planctomycetes // *Mol. Microbiol.*, 2009, vol. 73, no. 6, pp. 1009–1019, doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06841.x.
 186. Van Teeseling M.C.F., Mesman R.J., Kuru E., Espaillet A., Cava F., Brun Y.V., Vannieuwenhze M.S., Kartal B., and Van Niftrik L. Anammox Planctomycetes have a peptidoglycan cell wall // *Nat. Commun.*, 2015, vol. 6, no. 6878, pp. 1–6, doi: 10.1038/ncomms7878.
 187. Wagner M. and Horn M. The *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance // *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2006, vol. 17, no. 3, pp. 241–249, doi: 10.1016/j.copbio.2006.05.005.
 188. Wallner S.R., Bauer M., Würdemann C., Wecker P., Glöckner F.O., and Faber K. Highly enantioselective sec-alkyl sulfatase activity of the marine planctomycete *Rhodopirellula baltica* shows retention of configuration // *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2005, vol. 44, no. 39, pp. 6381–6384, doi: 10.1002/anie.200501955.
 189. Wang J., Ruan C.J., Song L., Li A., Zhu Y.X., Zheng X.W., Wang L., Lu Z.J., Huang Y., Du W., Zhou Y., Huang L., and Dai X. *Gimesia benthica* sp. nov., a planctomycete isolated from a deep-sea water sample of the northwest indian ocean // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2020, vol. 70, no. 7, pp. 4384–4389, doi: 10.1099/ijsem.0.004301.
 190. Wang X., Sharp C.E., Jones G.M., Grasby S.E., Brady A.L., and Dunfield P.F. Stable-isotope probing identifies uncultured planctomycetes as primary degraders of a complex heteropolysaccharide in soil // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015, vol. 81, no. 14, pp. 4607–4615, doi: 10.1128/aem.00055-15.
 191. Wegner C.E., Richter-Heitmann T., Klindworth A., Klockow C., Richter M., Achstetter T., Glöckner F.O., and Harder J. Expression of sulfatases in *Rhodopirellula baltica* and the diversity of sulfatases in the genus *Rhodopirellula* // *Mar. Genomics*, 2013, vol. 9, pp. 51–61, doi: 10.1016/j.margen.2012.12.001.

192. Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., and Holt K.E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads // *PLoS Comput. Biol.*, 2017, vol. 13, no. 6, pp. 1–22, doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
193. Wiegand S., Jogler M., and Jogler C. On the maverick *Planctomycetes* // *FEMS Microbiol. Rev.*, 2018, vol. 42, no. 6, pp. 739–760, doi: 10.1093/femsre/fuy029.
194. Wiegand S., Jogler M., Boedeker C., Pinto D., Vollmers J., Rivas-Marín E., Kohn T., Peeters S.H., Heuer A., Rast P., Oberbeckmann S., Bunk B., Jeske O., Meyerdierks A., Storesund J.E., Kallscheuer N., *et al.* Cultivation and functional characterization of 79 planctomycetes uncovers their unique biology // *Nat. Microbiol.*, 2020b, vol. 5, no. 1, pp. 126–140, doi: 10.1038/s41564-019-0588-1.
195. Margolin W. Ftsz and the division of prokaryotic cells and organelles // *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2016, vol. 6, no. 11, pp. 862–871, doi: 10.1038/nrm1745.FTSZ.
196. Wolin E.A., Wolin M.J., and Wolfe R.S. Formation of methane by bacterial extracts // *J. Biol. Chem.*, 1963, vol. 238, no. 8, pp. 2882–2886, doi: 10.1016/S0016-0032(13)90081-8.
197. Yadav S., Vaddavalli R., Siripuram S., Eedara R.V.V., Yadav S., Rabishankar O., Lodha T., Chintalapati S., and Chintalapati V.R. *Planctopirus hydrillae* sp. nov., an antibiotic producing Planctomycete isolated from the aquatic plant *Hydrilla* and its whole genome shotgun sequence analysis // *J. Antibiot.*, 2018, vol. 71, no. 6, pp. 575–583, doi: 10.1038/s41429-018-0035-1.
198. Yarwood S.A. and Högberg M.N. Soil bacteria and archaea change rapidly in the first century of Fennoscandian boreal forest development // *Soil Biol. Biochem.*, 2017, vol. 114, pp. 160–167, doi: 10.1016/j.soilbio.2017.07.017.
199. Yarza P., Yilmaz P., Pruesse E., Glöckner F.O., Ludwig W., Schleifer K.-H., Whitman W. B., Euzéby J., Amann R., and Rosselló-Móra R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences // *Nat. Rev. Microbiol.*, 2014, vol. 12, no. 9, pp. 635–645, doi: 10.1038/nrmicro3330.
200. Yin Y., Mao X., Yang J., Chen X., Mao F., and Xu Y. DbCAN: A web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation // *Nucleic Acids Res.*, 2012, vol. 40, no. W1, pp. 445–451, doi: 10.1093/nar/gks479.
201. Yoon J., Jang J.H., and Kasai H. *Algisphaera agarilytica* gen nov, sp nov, a novel representative of the class *Phycisphaerae* within the phylum *Planctomycetes* isolated from a marine alga // *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2014, vol. 105, no. 2, pp. 317–324, doi: 10.1007/s10482-013-0076-1.
202. Yoon J., Matsuo Y., Kasai H., and Lee M. Phylogenetic and taxonomic analyses of *Rhodopirellula caenicola* sp. nov., a new marine planctomycetes species isolated from iron sand // *J. Phylogenetics Evol. Biol.*, 2015, vol. 3, no. 1, pp. 10–13, doi: 10.4172/2329-9002.1000143.

203. Yun J., Deng Y., and Zhang H. Anthropogenic protection alters the microbiome in intertidal mangrove wetlands in Hainan Island // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, vol. 101, no. 15, pp. 6241–6252, doi: 10.1007/s00253-017-8342-1.
204. Zaicnikova M.V., Berestovskaya Y.Y., Akimov V.N., Kostrikina N.A., and Vasilieva L.V. *Singulispiera mucilagenosa* sp. nov., a novel acid-tolerant representative of the order *Planctomycetales* // *Microbiology*, 2011, vol. 80, no. 1, pp. 101–107, doi: 10.1134/s002626171101019x.
205. Zhaxybayeva O., Swithers K.S., Foght J., Green A.G., Bruce D., Detter C., Han S., Teshima H., Han J., Woyke T., Pitluck S., Nolan M., Ivanova N., Pati A., Land M.L., Dlutek M., et al. Genome sequence of the mesophilic *Thermotogales* bacterium *Mesotoga prima* MesG1.Ag.4.2 reveals the largest *Thermotogales* genome to date // *Genome Biol. Evol.*, 2012, vol. 4, no. 8, pp. 812–820, doi: 10.1093/gbe/evs059.
206. Zhilina T.N., Zavarzina D.G., Panteleeva A.N., Osipov G.A., Kostrikina N.A., Tourova T.P., and Zavarzin G.A. *Fuchsiella alkaliacetigena* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, lithoautotrophic homoacetogen from a soda lake // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2012, vol. 62, no. 7, pp. 1666–1673, doi: 10.1099/ijs.0.034363-0.