

На правах рукописи

Дзюба Марина Владимировна

**РАЗНООБРАЗИЕ МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ ПРЕСНЫХ
ВОДОЕМОВ ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ.**

03.02.03- микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в Федеральном Государственном Бюджетном Учреждении Науки Центре «Биоинженерия» РАН и Федеральном Государственном Бюджетном Учреждении Науки Институте микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Кузнецов Борис Борисович

Официальные оппоненты: Ивановский Руслан Николаевич
доктор биологических наук, ведущий
научный сотрудник кафедры микробиологии
биологического факультета МГУ им.
М.В.Ломоносова
Ушакова Нина Александровна
заведующая лабораторией инновационных
технологий Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт
проблем экологии и эволюции им. А.Н.
Северцова РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное унитарное
предприятие Государственный научно-
исследовательский институт Генетики и
селекции промышленных микроорганизмов

Защита состоится 19.02.2013 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета Д
501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по
адресу 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, корп. 12, биологический факультет
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, аудитория М-1 .

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ
имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «__» _____ 20__

Ученый секретарь

диссертационного совета

к.б.н. Пискунова Нина Федоровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность темы. Способность ориентироваться в геомагнитном поле была выявлена у различных организмов, в том числе, насекомых, птиц и млекопитающих (Киршвинк, 1989). Одним из самых ярких примеров магниторецепции являются магнитотактические бактерии (Blakemore, 1975). Магнитотактические бактерии (магнитобактерии, МТБ) представляют собой гетерогенную группу водных микроорганизмов, объединенных способностью ориентироваться во внешнем магнитном поле благодаря наличию в их клетках магнетосом – частиц магнетита (Fe_3O_4) или грейгита (Fe_3S_4), окруженных липопротеиновой мембраной. Эти микроорганизмы широко распространены в природе и играют значительную роль в круговороте железа, а также накоплении магнетита в придонных осадках (Bazyliński and Frankel, 2004). Кроме того, изучение магнитобактерий является актуальным сегодня благодаря уникальности свойств бактериальных магнитных наноразмерных частиц и их высокому биотехнологическому потенциалу.

Несмотря на значительный прогресс в изучении разнообразия МТБ (Blakemore, Maratea and Wolfe, 1979; Flies, Peplies and Schuler, 2005), механизма образования магнетосом (Komeili, 2007), а также генетических основ биоминерализации внутриклеточного магнетита (Jogler et al., 2009), многие вопросы остаются малоизученными. К их числу можно отнести вопросы происхождения и эволюции магнитотаксиса, а также тесно связанные с ними проблемы филогении МТБ. Кроме того, необходимо дальнейшее изучение таксономического разнообразия МТБ из различных природных источников. В частности, следует отметить недостаточное освещение вопросов видового разнообразия МТБ в водоемах Российской Федерации, которое сводится, в основном, к описанию встречающихся морфологических типов или описанию нового штамма уже известного вида (Чертов, 2000; Филина, 1998). Из-за трудностей культивирования на сегодняшний день в чистых культурах доступно не более 10 видов. Тем не менее, филогенетическое разнообразие некультивируемых МТБ может быть изучено с использованием молекулярно-экологических методов, основанных на определении и анализе последовательности генов 16S рРНК, так как эти бактерии, благодаря их способности к магнитотаксису, могут быть сконцентрированы из природных источников с помощью магнита. Применение комплексного подхода, включающего как классические микробиологические методы, предполагающие получение чистых культур и культивирование, так и молекулярно-экологические методы идентификации, для изучения видового разнообразия МТБ позволит не только более глубоко изучить представленность

различных МТБ в природных водоемах, но и расширить спектр штаммов, перспективных для биотехнологического применения.

Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы являлись поиск и изучение видового разнообразия магнитотактических бактерий из различных пресных водоемов европейской части России с использованием микробиологических и молекулярно-биологических методов. Для достижения заданной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) описать морфологическое разнообразие магнитотактических бактерий, выделенных из донных осадков, на примере следующих водоемов: озеро Селигер (Тверская обл.), река Ольховка (г. Кисловодск), река Аксай-Курмоярский (Волгоградская обл.), река Пшада (Краснодарский край) с помощью методов световой и просвечивающей электронной микроскопии;
- 2) описать филогенетическое разнообразие выявленных МТБ на основе данных анализа последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК;
- 3) выделить в чистые культуры, изучить физиологические особенности и определить таксономическое положение новых штаммов МТБ;
- 5) определить последовательность ДНК полноразмерного генома одного из выделенных штаммов и провести на основе полученных данных анализ генов, ответственных за метаболизм железа и биоминерализацию магнетита.

Научная новизна и практическая значимость работы. На основании комплексного исследования впервые описано морфологическое и филогенетическое разнообразие МТБ ряда пресных водоемов Российской Федерации. Полученные результаты научно-исследовательской работы дополняют имеющиеся данные о видовом разнообразии МТБ.

Выделены в чистую культуру и охарактеризованы ранее не описанные МТБ, относящиеся к роду *Magnetospirillum* и предположительно представляющие собой новые виды. Выделенные штаммы могут быть использованы для промышленного получения высококачественных магнитных наночастиц. Также в результате работы был описан новый вид бактерий *Magnetospirillum aberrantis* sp. nov. str. SpK, синтезирующий немногочисленные внутриклеточные кристаллы магнетита, но не обладающий способностью к магнитотаксису.

Секвенирован и аннотирован геном *Magnetospirillum aberrantis*. На основе последовательности генома *M. aberrantis* проведен анализ генов, предположительно ответственных за обмен железа и биоминерализацию внутриклеточного магнетита. Предложена гипотетическая схема этих процессов.

Реализация результатов исследований. Полученный в результате данной работы штамм *Magnetospirillum* SO-1 был использован в качестве продуцента бактериальных магнетосом при выполнении работ по государственному контракту Минобрнауки России №16.512.11.2128. На основе препарата магнетосом штамма *Magnetospirillum* SO-1 был создан прототип набора реактивов для выделения ДНК. Также полученный препарат магнетосом был использован для получения модифицированных бактериальных наночастиц с иммобилизованными на поверхности антителами с целью создания прототипа набора для проведения высокочувствительного иммуноферментного анализа.

Апробация работы и публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 2 научные статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных Министерством Образования и ВАК РФ. Опубликовано 7 тезисов докладов на российских и международных конференциях. Основные результаты диссертационной работы были представлены на 48-й научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2010), 14-ой Пуцинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2010), XVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2011» (Москва, 2011), Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2011; Москва, 2012), международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» (Москва, 2012), молодежной научной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2012).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов. Работа изложена на 130 страницах, содержит 7 таблиц и 18 рисунков. Список литературы содержит 170 источников, из которых 3 опубликовано в России и 167 зарубежных.

Сотрудничество и благодарности. Основная работа по анализу разнообразия МТБ с помощью молекулярно-экологических методов проводилась на базе центра коллективного пользования уникальным научным оборудованием, в группе молекулярной диагностики Центра «Биоинженерия» РАН (руководитель – к.б.н. Кузнецов Б.Б.). Выделение и исследование морфологии и физиологии новых штаммов было проведено на приборной базе лаборатории экологии и геохимической деятельности микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН (руководитель – д.б.н. Горленко В.М.). Химический состав включений *M. aberrantis* был определен на приборной базе РНЦ «Курчатовский институт» (руководитель - к.ф.-м.н. А.Л. Васильев). Секвенирование последовательностей нуклеиновых кислот фрагментов генов 16S рРНК было проведено на

приборной базе ЦКП, в группе мегасеквенирования Центра «Биоинженерия» РАН (руководитель - к.т.н. Т. В. Колгановой). Определение последовательности генома *M. aberrantis* было проведено совместно с сотрудниками лаборатории систем молекулярного клонирования Центра «Биоинженерия» РАН (руководитель д.б.н. Равин Н.В.). Автор выражает глубокую благодарность всем упомянутым участникам данной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Экспериментальные исследования выполнялись в период 2009-2012 гг.

Объектом исследования являлись магнитотактические бактерии донных осадков пресных водоемов – р. Ольховки, оз. Селигер, р. Аксай Курмоярский и р. Пшада. Бактерии были сконцентрированы с помощью магнита (1.1 Тл) из микрокосмов, сформированных из ила и воды исследуемых водоемов в соотношении 1:4, объем микрокосмов составил 3 л. Пробы воды и ила были отобраны из прибрежной зоны, с глубины около 0.5 м. На озере Селигер исследования проводили в течение двух лет, проводя отбор проб в разных точках таким образом, что было сформировано два микрокосма – «Селигер-1» и «Селигер-2». Микрокосмы (аквариумы) на протяжении всего времени проведения экспериментов содержали в темноте, при комнатной температуре. Магнит устанавливали у стенки аквариума с внешней стороны, на границе раздела фаз ил/вода. Через 1-3 часа у северного полюса магнита, с внутренней стороны стенки аквариума, формировалось видимое невооруженным глазом пятно, представляющее собой концентрированную фракцию МТБ. Отбор биомассы бактерий из пятна проводили с помощью стеклянной пипетки Пастера и полученный материал использовали для последующих экспериментов.

Морфологию бактерий изучали под световым микроскопом Olympus BX-41 и под просвечивающим электронным А JEM-100СХII с ускоряющим напряжением 80 кВ. Способность к магнитотаксису оценивали визуально, наблюдая под световым микроскопом за изменением направления движения клеток МТБ в зависимости от изменения направления оси магнита, расположенного на предметном столике микроскопа.

Библиотеки клонов последовательностей 16S рРНК исследуемых бактерий получали следующим образом. Суммарную ДНК из сконцентрированных клеток МТБ выделяли с помощью модифицированного метода Бирнбойма-Доли и Wizard-технологии («Promega», США). Полученный препарат ДНК использовали для амплификации гена 16S рРНК с помощью ПЦР (с использованием универсальных праймеров 11F и 1492R). Затем полученный продукт клонировали при помощи набора реактивов pGEM-T Easy System («Promega», США) в штамм DH10B *E. coli*, согласно рекомендациям производителя.

Клонированные фрагменты секвенировали на автоматическом секвенаторе ABI 3730 (“Applied Biosystems”, США) с использованием универсальных праймеров M13F, M13R и 530F.

Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК изучаемых бактерий с имеющимися в базе данных GenBank был проведен с помощью программного пакета BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Филогенетический анализ исследуемых МТБ проводили с использованием пакета программ MEGA 5, методом neighbor-joining.

Стратегия выделения чистых культур МТБ была основана на использовании метода капиллярной магнитной сепарации “race track” для эффективного отделения перед посевом клеток, способных к магнитотаксису, от других бактерий. Очищенными таким образом клетками МТБ засеивали питательные среды. Для получения отдельных колоний культуры магнитотаксических спирилл пересевали в столбики агаризованной (1.5%) гетеротрофной среды, содержащей сукцинат в качестве единственного источника углерода.

Филогенетический анализ выделенных магнитотаксических спирилл проводили, как описано выше.

С целью определения полиморфизмов на штаммовом/видовом уровне, использовали такие разновидности ПЦР-фингерпринтинга, как BOX-ПЦР (BOX repetitive elements), ERIC-ПЦР (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence) и AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) с использованием рестриктаз *Bse2II* и *XbaI*.

Для выделения культуры бактерий *M. aberrantis* была использована модифицированная среда Пфеннига (Pfennig and Lippert, 1966), в которые засеивали материал донных осадков р. Ольховки. Чистая культура *M. aberrantis* была получена с использованием модифицированного метода магнитной сепарации на основе накопительной культуры.

Для выделения и очистки магнитных включений *M. aberrantis* использовали метод ультразвукового разрушения клеток (Virsonic 600, США) с последующей сепарацией самих частиц на магнитных колонках (MACS Separation Columns, Германия). Изображения и картина дифракции магнитных включений штамма SpK были получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа модели TECNAI G2 30 с ускоряющим напряжением 300 кВ. Элементный состав был определен с помощью метода энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии.

Секвенирование генома *M. aberrantis* было проведено совместно с сотрудниками лаборатории систем молекулярного клонирования Центра «Биоинженерия» РАН на

секвенаторе 454 FLX (Roche). Сборку контигов проводили с помощью пакета программ Phred/Phrap/Consed. Определение открытых рамок считывания и их аннотацию проводили с помощью программного пакета Glimmer и сравнением с аналогичными последовательностями из международных баз данных KEGG, Uniprot, NR-NCBI. Идентификация и анализ предполагаемых генов обмена железа и биоминерализации магнетита проведен с помощью пакета программ Molquest v. 2.3.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Из литературных данных известно, что МТБ были обнаружены в олиго- и мезотрофных природных водоемах с выраженной стратификацией донных осадков (Flies C., Replies J. and Schuler D., 2004). Выбранные для исследования водоемы удовлетворяли всем перечисленным условиям. Исследования МТБ вели в микрокосмах, сформированных из воды и ила выбранных водоемов, поскольку это позволяло вести длительные наблюдения в лабораторных условиях.

1. Морфологическое разнообразие МТБ исследуемых водоемов.

Изучение морфологии сконцентрированных клеток МТБ методами световой и просвечивающей электронной микроскопии выявило присутствие различных морфотипов, преобладающим из которых почти во всех микрокосмах (за исключением микрокосма «Пшава») являлись магнитные кокки (рис. 1).

В микрокосме «Ольховка» на протяжении всего времени исследования преобладали подвижные магнитные кокки, размером 1-2 мкм. На микрофотографии кокков из микрокосма «Ольховка» видны расположенные по периферии клетки магнетосомы, диаметром 45-55 нм. Кроме того, в клетках выявляются крупные электрон-плотные включения, занимающие большую часть объема клетки (Рис. 1А).

В микрокосмах «Селигер-1» и «Селигер-2» также преобладали магнитные кокки, а в микрокосме «Селигер-2» было выявлено присутствие магнитных спирилл в качестве минорного компонента. Магнитные кокки, выявленные в микрокосмах «Селигер-1» и «Селигер-2» различались по морфологическим особенностям. Магнитотактические кокки (размером 1,5-2 мкм) из микрокосма «Селигер-1» содержали две цепочки магнетосом, расположенные под углом друг к другу. Диаметр магнетосом составлял 45-50 нм. Клетки подвижны с помощью двух пучков жгутиков (рис. 1Б). Магнитные кокки из микрокосма «Селигер-2» (размер 1-1,5 мкм) содержали магнетосомы диаметром 45-50 нм, объединенные в множественные цепочки, а также присутствующие в виде скоплений (рис. 1В).

В микрокосме «Аксай-Курмоярский» преобладали магнитные кокки, в качестве минорного компонента присутствовали магнитотактические спирали. На микрофотографии магнитотактических кокков, выявленных в данном микрокосме, видны магнетосомы, диаметром 45-55 нм, объединенные в единственную цепочку (рис. 1Г).

Особенностью микрокосма «Пшава» являлось преобладание среди МТБ вибрионов, размером 0.5×2.0 мкм. Магнитотактические кокки присутствовали в качестве минорного компонента. В клетках магнитотактических вибрионов микрокосма «Пшава» присутствовала единственная цепочка крупных, диаметром 100-120 нм, магнетосом. Благодаря своим крупным размерам, магнетосомы этих МТБ выявляются даже под световым микроскопом (рис. 1 Д, Е).

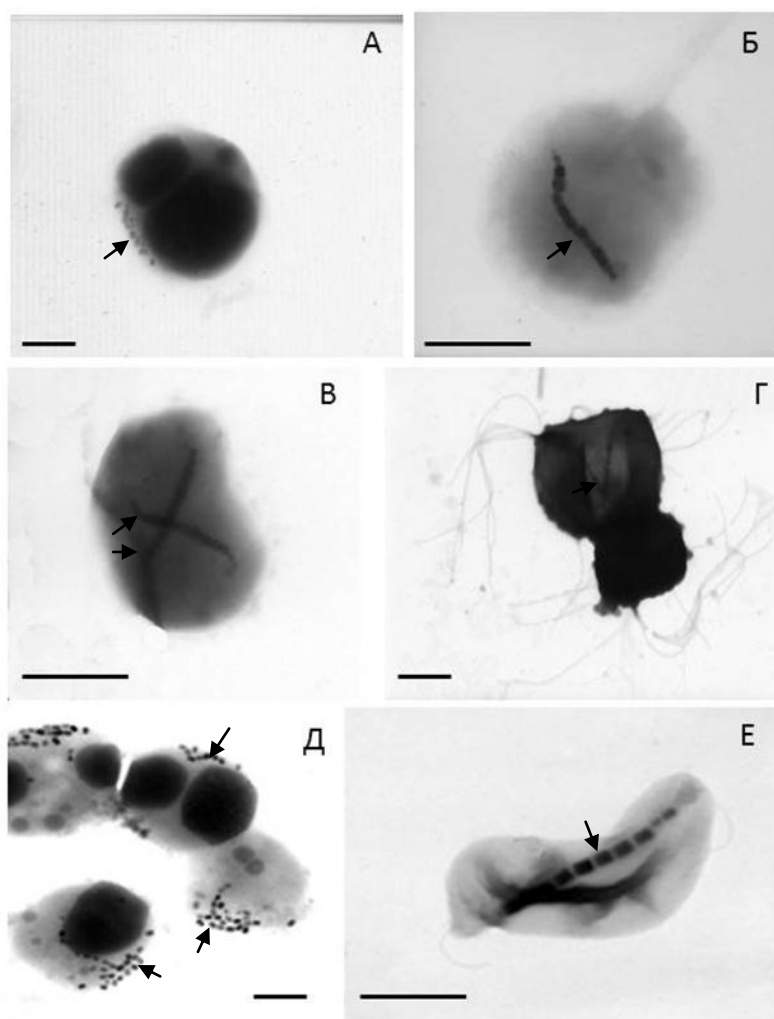


Рисунок 1. Морфология магнитотактических бактерий, выявленных в результате исследования. А – МТБ микрокосма «Ольховка»; Б – МТБ микрокосма «Аксай-Курмоярский»; В, Г – МТБ микрокосма «Селигер-1»; Д – МТБ микрокосма «Селигер-2»; Е – МТБ микрокосма «Пшава». Стрелками обозначены магнетосомы. Масштабная линейка 0.5 мкм.

Таким образом, по данным микроскопических исследований, в изученных водоемах наблюдалось значительное морфологическое разнообразие МТБ. В большинстве микрокосмов преобладали магнитотактические кокки. Кроме того, у выявленных МТБ варьировали размеры и внутриклеточная локализация магнетосом.

2. Филогенетическое разнообразие магнитотактических кокков исследуемых водоемов.

Для МТБ, выявленных в донных осадках каждого из исследуемых водоемов, были получены библиотеки клонов, содержащих вставки фрагментов генов 16S рРНК. В результате проведения филогенетического анализа фрагментов было обнаружено, что преобладающие флотипы во всех исследуемых микрокосмах, кроме микрокосма «Пшава», принадлежат магнитотактическим коккам. Всего в настоящей работе было выявлено 8 флотипов магнитотактических кокков (рис. 2). В микрокосме «Ольховка» выявлено 2 флотипа, один из которых является доминирующим (Olkh-1) и включает 62 последовательности. Было показано, что данные последовательности идентичны последовательности 16S рРНК некультивируемого магнитного кокка, обнаруженного ранее в донных осадках озера Чимси, Бавария (Flies, Peplies and Schuler, 2005). Другой обнаруженный нами флотип (Olkh-2) представлен всего одной последовательностью и образует на дереве отдельную кладу. Оба этих флотипа входят в единый кластер с тремя флотипами SELII магнитотактических кокков, выявленными в микрокосме «Селигер-2».

Единственный флотип, выявленный в микрокосме «Селигер-1» - SELI - формирует отдельный кластер. Наибольшее число флотипов магнитотактических кокков, четыре, выявлено в микрокосме «Аксай-Курмоярский». Три из них – Aks-1, Aks-2, Aks-3 объединяются в единый кластер, в то время как Aks-4 входит в состав отдельного кластера, вместе с последовательностями некультивируемых пресноводных магнитных кокков, обнаруженных ранее в других исследованиях (Flies, Peplies and Schuler, 2005). На представленной дендрограмме видно, что все обнаруженные флотипы образуют единый кластер с последовательностями других некультивируемых пресноводных магнитотактических кокков, в то время как морские культивируемые кокки *Magnetococcus marinus* MC-1 и MO-1 формируют отдельный кластер, представители которого недавно были объединены в семейство Magnetococcaceae, порядок Magnetococcales (Bazylynski et al., 2012). Уровень ветвления кластеров на полученной нами дендрограмме позволяет предположить, что некультивируемые пресноводные и культивируемые морские магнитотактические кокки принадлежат к различным семействам, относящимся к порядку Magnetococcales класса Alphaproteobacteria. Однако отсутствие культивируемых

представителей группы пресноводных магнитотактических кокков оставляет этот вывод на уровне предположения.

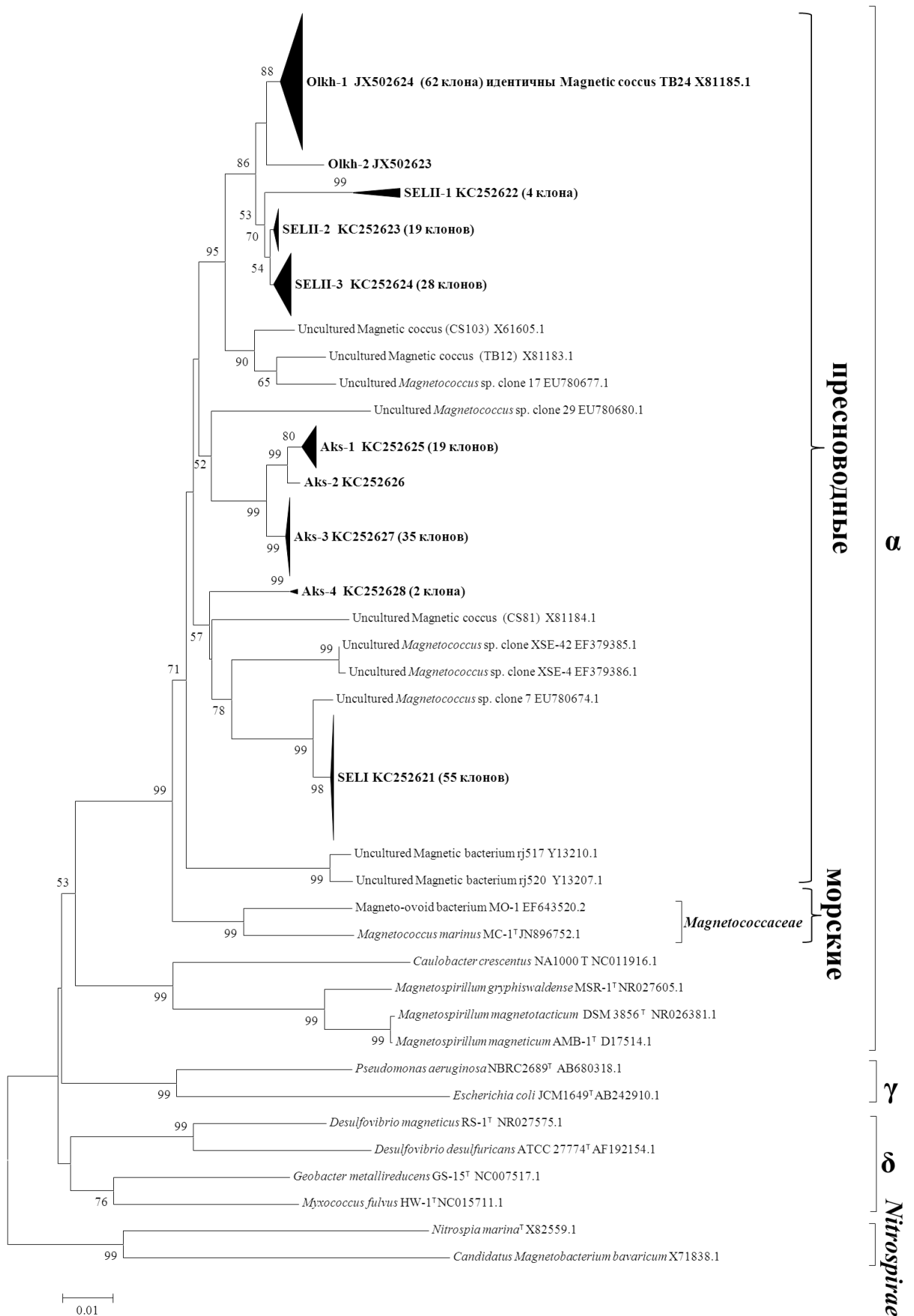


Рисунок 2. Филогенетический анализ клонов фрагментов генов (1300 п.о.) 16S рРНК магнитотактических кокков исследуемых водоемов. Дерево построено с помощью алгоритма neighbor-joining, с анализом 1000 альтернативных деревьев. Цифры указывают достоверность bootstrap-анализа. Типовые штаммы обозначены надстрочным Т. Внизу дан масштаб эволюционных расстояний. Филотипы исследуемых магнитотактических кокков выделены жирным шрифтом. Обозначения Aks – филотипы магнитотактических кокков, выявленные в микрокосме «Аксай-Курмоярский»; SELI – филотип магнитотактических кокков, выявленные в микрокосме «Селигер-1»; SELII – филотипы магнитотактических кокков, выявленные в микрокосме «Селигер-2»; Olkh – филотипы магнитотактических кокков, выявленные в микрокосме «Ольховка»; арабскими цифрами через дефис обозначены номера филотипов; α – Alphaproteobacteria, γ – Gammaproteobacteria, δ – Deltaproteobacteria.

Несмотря на то, что под световым микроскопом среди МТБ, полученных из микрокосмов «Селигер-2» и «Аксай Курмоярский», наблюдали немногочисленные клетки магнитотактических спирилл, в результате анализа библиотек клонов не были обнаружены соответствующие им филотипы. Это указывает на то, что магнитотактические спириллы представлены в качестве минорного компонента.

Следует отметить, что в микрокосме «Пшада» в результате анализа клональных библиотек не было обнаружено последовательностей, сходных с последовательностями МТБ, имеющимися в базе данных Genbank. Этот факт может указывать на принадлежность наблюдаемых бактерий филогенетическим группам, среди которых МТБ ранее не были выявлены. Таким образом, филогенетическое разнообразие МТБ р. Пшада нуждается в дальнейшем изучении.

3. Характеристика новых штаммов магнитотактических спирилл.

В результате последовательного применения магнитной сепарации, метода “race track” (капиллярной магнитной сепарации) МТБ из донных осадков р. Ольховка, оз. Селигер и р. Пшада и последующем посеве содержимого кончика капилляра на питательные среды, в среде, содержащей сукцинат натрия в качестве единственного источника углерода, наблюдали рост микроорганизмов. Отдельные колонии были получены после пересева клеток из жидкой культуры в столбики агаризованной среды следующего состава (г/л): K_2HPO_4 , 0.7; NaNO_3 , 0.15; тиогликолят натрия, 0.2; сукцинат натрия, 0.4; натрий виннокислый, 0.4; ацетат натрия, 0.05; цитрат железа (III) 50 мкМ; резазурин 0.2 мг/л; агар 1.5%, растворы витаминов и микроэлементов, по 1 мл (Bryantseva

et al., 1999), рН 6.8. Штаммы магнитотактических спирилл, выделенных из донных осадков р. Ольховка, оз. Селигер и р. Пшада были обозначены как SO-1, Sel-1 и SP-1 соответственно.

Клетки выделенных штаммов представляли собой спириллы. Размер клеток SO-1 составил $0.3-0.4 \times 1.2-3.0$ мкм, SP-1 и Sel-1 – $0.3-0.4 \times 1.5-5$ мкм. На электронных микрофотографиях каждого из штаммов выявляется единственная цепочка магнетосом, расположенная вдоль длинной оси клетки, диаметр частиц составляет 45-55 нм (Рис. 3).

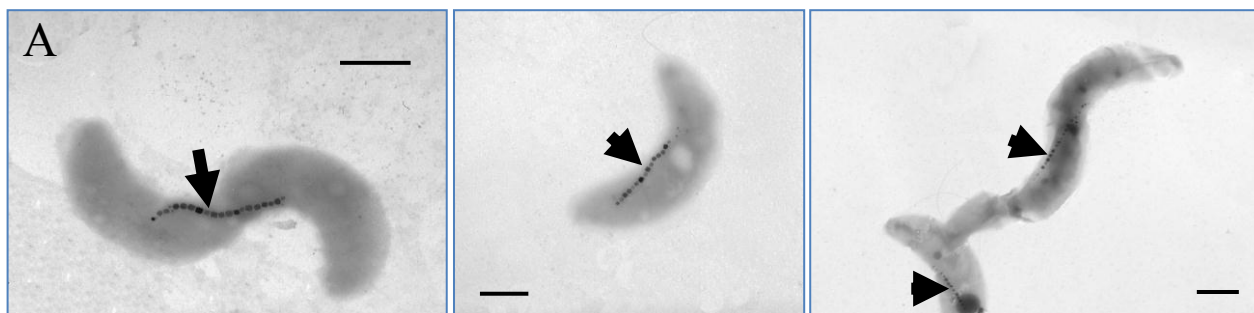


Рисунок 3. Морфология выделенных штаммов магнитотактических спирилл. А – SO-1; Б – SP-1; В – Sel-1. Масштабная линейка – 0.4 мкм; стрелками обозначены магнетосомы.

Штаммы *Magnetospirillum spp.* SO-1, SP-1 и Sel-1 развивались в диапазоне температур 18-42 °С, с оптимальным ростом при 28 °С. Оптимум рН для роста составил 6.5-6.8.

Штаммы росли хемоорганогетеротрофно, на средах с карбоновыми кислотами. Наилучший рост SP-1 и Sel-1 наблюдается на средах с фумаратом, малатом, сукцинатом, SO-1 – с сукцинатом, бутиратом и лактатом в качестве единственных источников углерода и доноров электронов. Добавление дрожжевого экстракта (0.1 г/л) и витаминов приводило к незначительному увеличению роста. На средах без железа бактерии прекращали синтез магнетосом.

Все три штамма - микроаэрофилы. Для SP-1 и Sel-1 оптимальным для роста было содержание кислорода в газовой фазе 1-5%. Для SO-1 характерна способность к аэробному росту, однако оптимальным содержанием для роста культуры и формирования магнетосом является содержание кислорода в газовой фазе 2-3%. Способность к анаэробному росту с использованием нитратов в качестве альтернативных акцепторов электронов не обнаружена.

Анализ последовательностей генов 16S рРНК (1300 п.о.) выделенных штаммов с помощью BLAST показал, что наиболее сходными с ними являются последовательности представителей рода *Magnetospirillum*. Наибольшее сходство последовательности 16S рРНК проявляют с видами *M. magneticum* и *M. magnetotacticum* – 98-99%. Для выделенных

в настоящей работе штаммов также показана высокая степень сходства последовательностей 16S рНК между собой (табл. 1).

Таблица 1. Уровни подобия последовательностей гена 16S рНК изучаемых штаммов магнитотактических спирилл между собой и с описанными ранее представителями рода *Magnetospirillum*. Вычислено с помощью Sequence ID/Similarity (BioEdite 7.0.9.0.)

Представители рода <i>Magnetospirillum</i>	SO-1	SP-1	Sel-1	<i>Magnetospirillum aberrantis</i> SpK	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1	<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1	<i>Magnetospirillum magneticum</i> MGT-1	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1	<i>Magnetospirillum bellicus</i> str. VDY
<i>SO-1</i>	100.0%	98.0%	97.5%	95.3%	99.6%	99.6%	99.6%	95.6%	95.5%
<i>SP-1</i>	98.0%	100.0%	98.3%	94.9%	98.1%	97.7%	97.6%	95.1%	95.1%
<i>Sel-1</i>	97.5%	98.3%	100.0%	95.3%	98.0%	97.7%	97.5%	95.4%	94.8%
<i>Magnetospirillum aberrantis</i> SpK	95.3%	94.9%	95.3%	100.0%	95.3%	95.4%	95.1%	95.6%	96.7%
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1	99.6%	97.7%	98.0%	95.3%	100.0%	99.5%	99.4%	95.6%	95.5%
<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1	99.6%	97.7%	97.7%	95.4%	99.5%	100.0%	99.7%	95.4%	95.5%
<i>Magnetospirillum magneticum</i> MGT-1	99.6%	97.6%	97.5%	95.1%	99.4%	99.7%	100.0%	95.5%	95.3%
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1	95.6%	95.1%	95.4%	95.6%	95.6%	95.4%	95.5%	100.0%	95.7%
<i>Magnetospirillum bellicus</i> str. VDY	95.5%	95.1%	94.8%	96.7%	95.5%	95.6%	95.3%	95.7%	100.0%

Таким образом, на основании полученных результатов выделенные штаммы были отнесены к роду *Magnetospirillum*. На представленной дендрограмме показано, что SO-1 входит в единый кластер с *M. magneticum* и *M. magnetotacticum*, в то время как SP-1 и Sel-1 вместе образуют отдельный кластер (рис. 4).

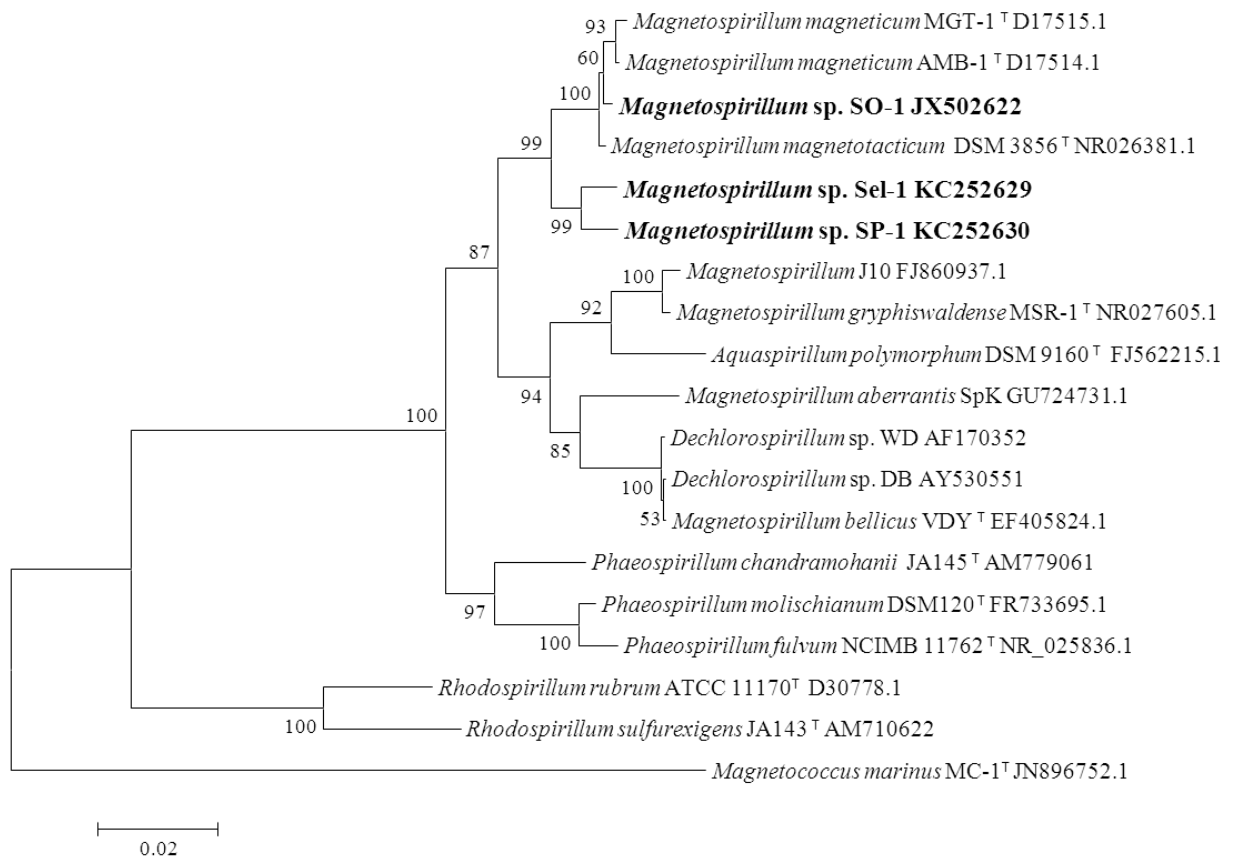


Рисунок 4. Филогенетическое положение выделенных штаммов магнитотактических спирилл и *M. aberrantis*. Алгоритм – neighbor-joining. Дерево построено с помощью алгоритма neighbor-joining, с анализом 1000 альтернативных деревьев. Цифры указывают достоверность bootstrap-анализа. Надстрочный Т - типовые штаммы. Внизу дан масштаб эволюционных расстояний. Изучаемые штаммы выделены жирным шрифтом.

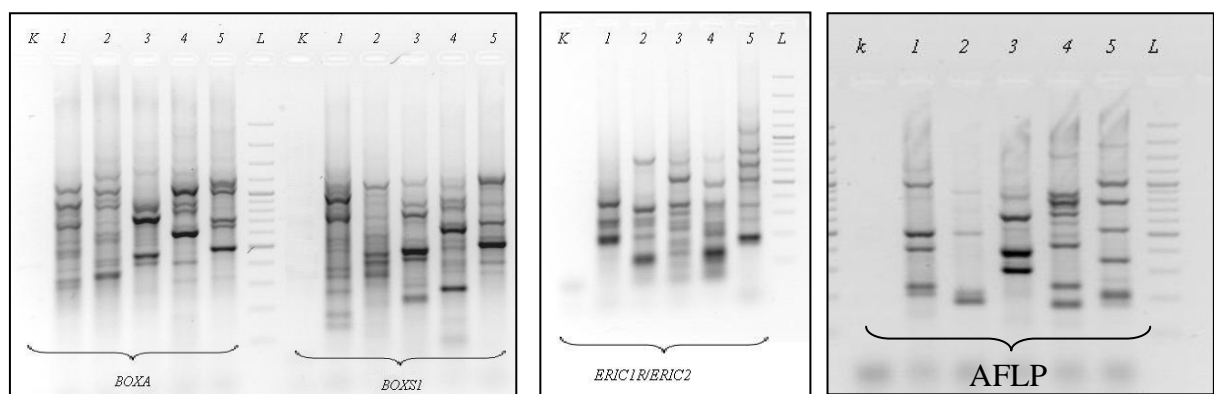


Рисунок 5. Электрофореграммы фингерпринтинг-ПЦР (А, Б) и AFLP-анализа (В). 1 – SO-1; 2 – SP-1; 3 – Sel-1; 4 – *M. magnetotacticum*; 5 – *M. gryphiswaldense*; М – маркер; К – контроль.

На электрофореграмме ПЦР-продуктов, полученных с помощью фингерпринтинг-ПЦР видно, что паттерны у всех анализируемых штаммов значительно отличались числом и размерами ПЦР-фрагментов (рис. 5). Совокупность результатов филогенетического анализа и фингерпринтинга указывают на то, что штаммы SP-1 и Sel-1 могут быть идентифицированы как новые виды рода *Magnetospirillum*, в то время как SO-1 благодаря его близости к *M. magneticum* может быть определен как новый изолят этого вида.

4. *Magnetospirillum aberrantis* sp. nov. штамм SpK – новая пресноводная бактерия с магнитными включениями.

Кроме магнитотактических спирилл, из донных осадков реки Ольховки был выделен ранее не описанный вид бактерий. Чистая культура была получена методом предельных разведений накопительной культуры, полученной после посева материала донных осадков в среду следующего состава (г/л): KH_2PO_4 , 0.4; NH_4Cl , 0.33; KCl , 0.33; $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.33; Na_2SO_4 , 0.25; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.25; NaNO_3 , 0.33; NaHCO_3 , 0.25, цитрат железа III 30 мкМ; ацетат натрия, 1; дрожжевой экстракт, 0.1; а также ресазурин, 0.5 мг/л; натрий тиогликолят, 50 мг/л; витамин B12, 15 мкг/л, микроэлементы 1 мл (Bryantseva et al., 1999). Бактерии, размером 0.4×1.5 мкм обладали подвижностью с помощью полярно расположенных жгутиков (рис. 6А, Б). Характерной особенностью бактерий штамма SpK является образование мелких плотных гранул размером 30-40 нм, располагающихся в клетках гроздьями, или в виде коротких цепочек (рис. 6 В, Г). Показано, что включения обладают магнитными свойствами (рис. 6 Д), однако они не объединяются в длинные цепочки, характерные для бактериальных магнетосом. Способностью к магнитотаксису выделенные бактерии не обладают.

Клетки развивались в диапазоне температур 20 – 45°C, с оптимальным ростом при 31°C. Наилучший рост наблюдался при pH 6.5 – 6.9. Основной тип метаболизма – хемоорганотрофный. Микроаэрофилы, оптимальный рост при 1 – 5% кислорода в газовой фазе. Способность к анаэробному росту с использованием нитратов в качестве альтернативного акцептора электронов не выявлена. Каталазная активность в клетках отсутствует, тогда, как оксидазная обнаружена. Хорошо растут на среде со многими карбоновыми кислотами. Наилучший рост на ацетате и фумарате. Сахара и спирты не поддерживали рост.

С помощью ПЦР было показано, что выделенные бактерии содержат ген *RuBisCo cbbM* (форма II). Однако способность к автотрофному росту не была выявлена при использовании таких возможных доноров электронов как тиосульфат, аммоний и закисное железо. Содержание Г-Ц в ДНК 62.6%. Содержат убихинон Q₁₀. Состав основных жирных

кислот: 18:1 ω 7 – 58.19%; 16:0 – 19.23%; 16:1 ω 7 – 11.12%; 18:0 – 1.91%. Резервные вещества – полигидроксibuтират и полифосфаты.

Анализ последовательностей нуклеотидов гена 16S рРНК показал принадлежность выделенного штамма к классу *Alphaproteobacteria*, к семейству *Rhodospirillaceae*, к роду *Magnetospirillum*.

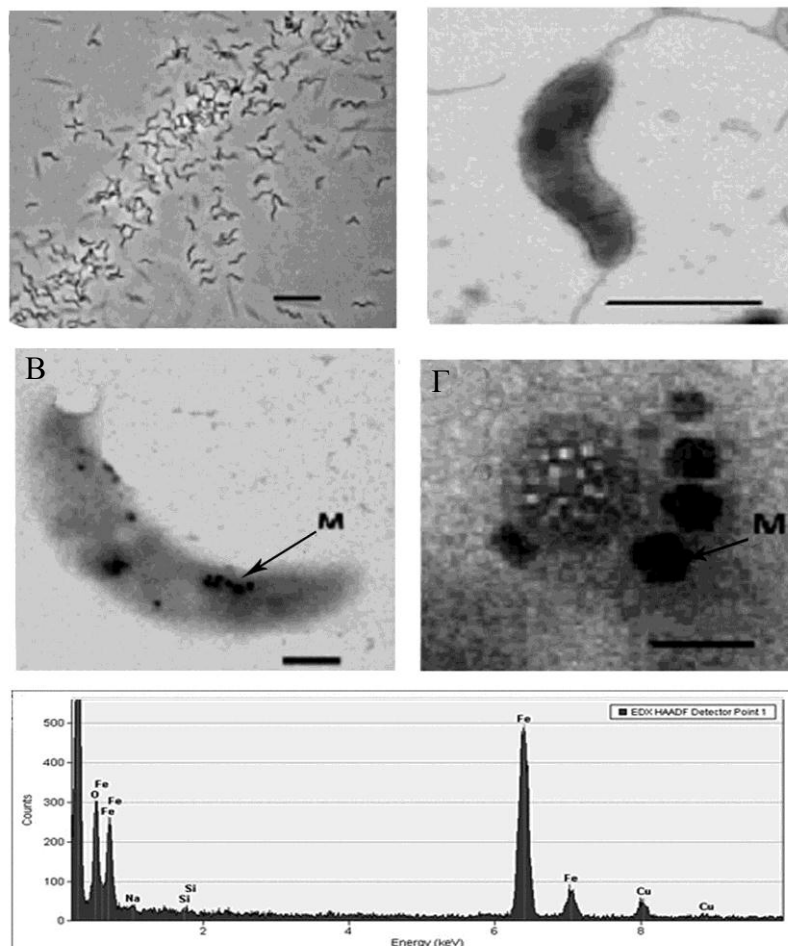


Рисунок 6. Морфология клеток и магнитных включений *M. aberrantis*. А. Световая микроскопия, фазовый контраст. Б. Жгуты на полюсах клетки. В, Г. Магнитные включения внутри клеток, обозначены М. Д. Элементный состав для минеральных включений штамма *M. aberrantis* по данным энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии соответствуют магнетиту. Масштабная линейка А – 5 мкм; Б – 1 мкм; В – 0.5 мкм; Г – 100 нм

На филогенетическом дереве, представленном на рисунке 4 штамм SpK формировал отдельный кладу, занимающую промежуточное положение между родами *Dechlorospirillum* и *Magnetospirillum*. Уровни сходства последовательности гена 16S рРНК штамма SpK с известными видами рода *Magnetospirillum* составил от 96.1% до 96.4%. Таким образом, таксономическое положение исследованного микроорганизма было

определено как новый вид рода *Magnetospirillum*, которому предложено название *Magnetospirillum aberrantis* sp. nov. (*aberrantis*, L. neut. adj. отличный, отклоняющийся от других).

5. Реконструкция метаболизма железа и биоминерализации магнетита бактерии *Magnetospirillum aberrantis* SpK на основе анализа секвенированного генома.

M. aberrantis – первый представитель рода *Magnetospirillum*, синтезирующий немногочисленные нерегулярные внутриклеточные включения магнетита (30-35 нм), но не способный к магнитотаксису. Нами была выдвинута гипотеза, что такой фенотип может обеспечивать некий минимальный набор генов, необходимых для биоминерализации внутриклеточного магнетита, причем эти гены могут представлять собой ортологи генов, вовлеченных в процесс синтеза магнетосом у МТБ. Для проверки данной гипотезы был проведен сравнительный анализ генома *M. aberrantis*, который позволил выявить гены, предположительно ответственные за обмен железа и синтез магнетита. Последовательности фрагментов генома (контигов) депонированы в Genbank под номером PRJNA54001. На основе полученных данных предложена гипотетическая схема, отражающая процессы поглощения, восстановления и запасания железа, а также синтеза внутриклеточных кристаллов магнетита у *M. aberrantis* (рис. 7)

Определенная в результате работы последовательность генома *M. aberrantis* включала 63 значимых контига, общей длиной 4158192 пар оснований (п.о.). В них обнаружены 3878 открытых рамок считывания (ОРС) (табл. 2).

Таблица 2. Сравнительная характеристика геномов представителей рода *Magnetospirillum*

Свойства	<i>M. aberrantis</i> SpK	<i>M. magneticum</i> AMB-1*	<i>M.</i> <i>gryphiswaldense</i> MSR-1*	<i>M.</i> <i>magnetotacticum</i> MS-1*
Размер генома, п.о.	4158192	4967148	4264908	4503280
GC состав (%)	59,9	65,1	62,1	64
Общее число контигов	254	1	373	316
Наличие плазмид	Нет	Нет	1	Нет
Число аннотированных открытых рамок считывания	3878	4559	4268	4925
Число генов тРНК	54	50	47	44
Число генов 16S/23S/5S рРНК	1/1/1	2/2/НА	2/2/2	2/2/2

* данные из Richter et al., 2007; НА – не аннотирован

Краткое описание схемы обмена железа и биоминерализации магнетита. В геноме *M. aberrantis* нами был обнаружен набор из 21 ОРС, проявляющих высокую степень сходства с генами белков, ответственных за сидерофор-зависимый транспорт Fe^{3+} . Две из них кодируют белки, сходные с FecE и FhuA, продукты которых входят в системы транспорта сидерофоров цитратного и гидроксаматного типа. Но в геноме отсутствуют ОРС, проявляющие значимый уровень подобия с генами остальных компонентов систем сидерофорного транспорта Fhu и Fec – FhuBCD и FecABCD. При этом у *M. aberrantis* выявляются полноценные ОРС, кодирующие TonB-бокс и ABC-транспортеры. Высвобождение ионов железа из Fe^{3+} -сидерофорных комплексов сопряжено с восстановлением ионов Fe^{3+} до Fe^{2+} . Как правило, этот процесс осуществляет фермент железоредуктаза (EC 1.16.1.7).

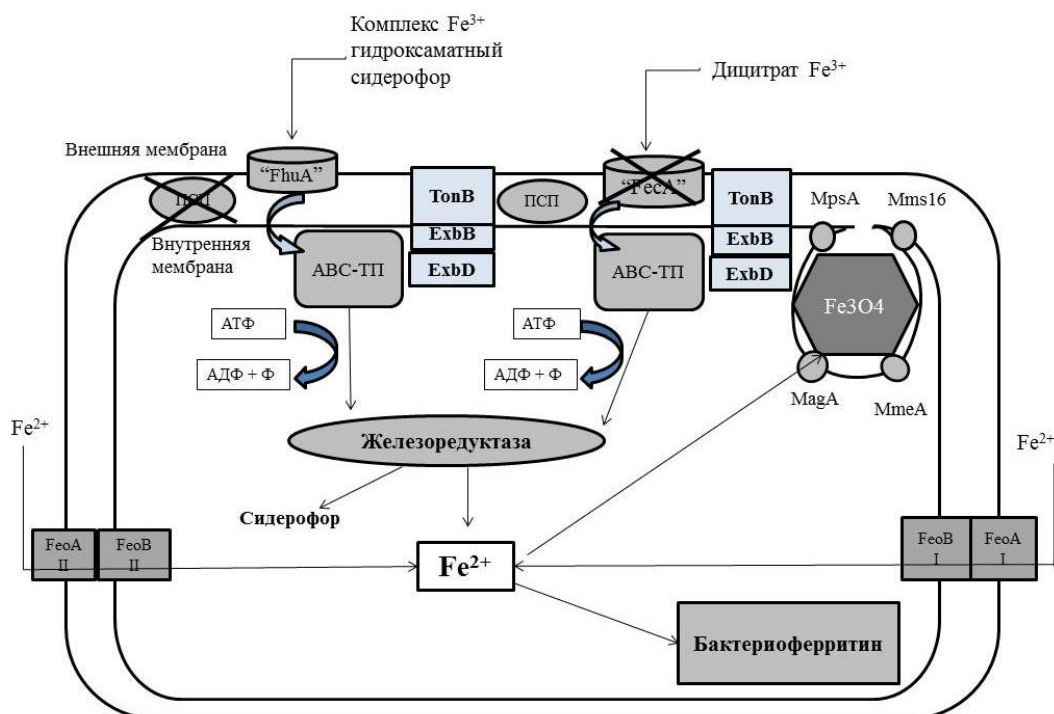


Рисунок 7. Гипотетическая схема метаболизма железа и биоминерализации магнетита *M. aberrantis*, предложенная на основе анализа генома. Обозначения: ABC-ТП – комплекс ABC-транспортеров; ПСП – периплазматический связывающий белок. Зачеркнутые компоненты – белки систем транспорта сидерофоров, ОРС которых не были обнаружены в геноме.

В геноме *M. aberrantis* присутствует одна ОРС, предположительно кодирующая этот фермент. Железоредуктаза *M. aberrantis* наиболее сходна с железоредуктазой *M. gryphiswaldense* (уровень подобия 74%). В результате проведенного анализа было показано, что в геноме *M. aberrantis* закодировано два набора белков систем транспорта Fe^{2+} FeoAB. Известно, что двойная система транспорта также характерна для

магнитотактических спирилл. Функцию запасания железа в клетках *M. aberrantis* выполняют бактериоферритины. Наиболее высоким уровнем сходства с бактериоферритинами *M. aberrantis* обладают аналогичные белки *M. magnetotacticum* (уровень подобия 69%). Сравнительный анализ показал, что в геноме *M. aberrantis* отсутствуют ОРС, имеющие значимый уровень подобия (> 50%) с генами, относящимися к т.н. «магнетосомному геномному островку» (MAI – magnetosome gene island). Из литературных данных известно, что MAI представляет собой участок генома, содержащий большую часть генов, определяющих магнитотактический фенотип у *Magnetospirillum*. Тем не менее, нами были найдены 4 ОРС, обладающие высоким уровнем подобия (> 75%) с генами белков, обнаруженных ранее в мембране магнетосом, но не относящихся к MAI: *magA*, *mpsA*, *mmeA* и магнетосомной ГТФ-азы P16 – *mms16*. Мы предположили, что белки, соответствующие этим генам у *M. aberrantis*, выполняют сходные функции с аналогичными белками у *M. magneticum* АМВ-1, контролируя процесс инвагинации мембраны и транспорт ионов Fe^{2+} внутрь везикул. Предложенная гипотетическая схема имеет существенные отличия от таковой, предложенной для магнитотактических спирилл. Ограниченность набора генов, кодирующих белки, предположительно ответственные за минерализацию магнетита, обуславливает нерегулярность магнитных включений, отсутствие их постоянных объединений в виде цепочек или крупных агломератов, и, следовательно, отсутствие у *M. aberrantis* способности к магнитотаксису. При этом процесс поглощения Fe^{2+} в общих чертах сходен с таковым у магнитотактических спирилл и имеет ту же характерную особенность – наличие двух систем транспорта FeoAB. Совокупность полученных нами данных позволила предположить, что *M. aberrantis* представляет собой форму, вторично утратившую способность к магнитотаксису в процессе эволюции, вероятно, в результате крупной делеции. Имеющиеся литературные данные о нестабильности и частых делециях в области MAI у других представителей *Magnetospirillum* также свидетельствуют в пользу данной гипотезы.

ВЫВОДЫ.

1. В исследованных водоемах были определены преобладающие морфотипы МТБ. В донных осадках озера Селигер, рек Ольховка и Аксай-Курмоярский преобладающим морфотипом МТБ являлись кокки. В донных осадках реки Пшада преобладающим морфотипом являлись вибрионы.

2. В результате филогенетического анализа среди выявленных в донных осадках исследуемых водоемов МТБ было показано наличие 10 различных фило типов магнитотактических кокков, формирующих на дендрограмме единый кластер с описанными ранее последовательностями пресноводных магнитотактических кокков, предположительно соответствующий отдельному семейству внутри порядка *Magnetococcales*.

3. Выделено в чистые культуры три новых штамма магнитотактических спирилл, SO-1, SP-1 и Sel-1, относящихся к роду *Magnetospirillum*, по крайней мере, два из них относятся к новым видам.

4. Описан новый вид бактерий – *Magnetospirillum aberrantis* штамм SpK, способный к синтезу немногочисленных внутриклеточных включений магнетита, но не обладающий способностью к магнитотаксису.

5. На основе результатов секвенирования генома *Magnetospirillum aberrantis* проведен анализ генов, предположительно ответственных за метаболизм железа и биоминерализацию магнетита. На основе полученных результатов построена гипотетическая схема этих процессов. Показано, что у *M. aberrantis* отсутствуют гены магнетосомного геномного островка (MAI), но имеются гены *mms16*, *magA*, *mpsA* и *mmeA*, участвующие в процессах биоминерализации у *Magnetospirillum*.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Горленко В.М., Дзюба М.В., Малеева А.Н., Пантелеева А.Н., Колганова Т.В., Кузнецов Б.Б. *Magnetospirillum aberrantis* sp.nov. – новая пресноводная бактерия с магнитными включениями // Микробиология. 2011. Т. 80 №5. С. 679-690.
2. Дзюба М.В., Марданов А.В., Белецкий А. В., Колганова Т.В., Сухачева М.В., Шеленков А.А., Горленко В.М., Кузнецов Б.Б., Скрябин К.Г. Реконструкция путей метаболизма железа у бактерии *Magnetospirillum aberrantis* SpK по результатам анализа секвенированного генома // Доклады академии наук, 2012. т. 444, № 3.С 335-338.

Тезисы конференций.

1. Дзюба М.В., Сухачева М.В. Молекулярная идентификация новых штаммов магнитотактических спирилл // «Актуальные проблемы современной микробиологии»: 8-я молодежная школа-конференция с международным участием. – ИНМИ им. С.В. Виноградского РАН. Москва, 2012. – С. 65-67.
2. Дзюба М.В. Новые штаммы бактерий, синтезирующие внутриклеточные магнитные наночастицы // Сборник материалов международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии». Москва, 20 – 22 марта 2012 г. – С. 268.
3. Дзюба М.В., Горленко В.М. Кузнецов Б.Б. *Magnetospirillum* sp. SO-1 – новый штамм бактерий-продуцентов магнитных наночастиц // Тезисы докладов и стендовых сообщений, XXIV Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии Москва, 7-9 февраля 2012. ИБХ РАН. С. 24.
4. Дзюба М.В. Изучение механизма образования магнетосом у *Magnetospirillum aberrantis* на основе анализа генома // Тезисы докладов и стендовых сообщений, XXIII Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии, ИБХ РАН. Москва, 2011. С. 138.
5. Малеева А.Н., Дзюба М.В. Изучение видового разнообразия магнитотактических бактерий озера Селигер и реки Пшада // Ломоносов-2011: XVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых; секция «Биология»: Тезисы докладов. Москва, 2011. С. 165-166.
6. Дзюба М.В., Сорокина А.Ю., Курек Д.В., Малеева А.Н., Груздев Д.С. Исследование морфологии магнетосом, выделенных из ранее неопisanного рода

магнитотактических спиралей, с помощью методов электронной просвечивающей (ПЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ) – 14-ая международная пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» 19-23 апреля 2010 г.: Сборник тезисов, Т.1. Пушино, 2010. С. 242-243.

7. **Малеева А.Н., Груздев., Д.С., Дзюба М.В.** Применение методов молекулярной экологии для поиска и идентификации магнитотактических бактерий. – тезисы 48-й Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». Новосиб. Гос. Ун-т. Новосибирск, 2010. С. 265