

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



УЗУН МАРИЯ МИХАЙЛОВНА

**ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ И ЭВОЛЮЦИИ
НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ**

1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2023

Диссертация подготовлена в ЦКП «Биоинженерия» Института биоинженерии им. К.Г. Скрыбина ФИЦ Биотехнологии РАН и на кафедре синтетической биологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

**Научные
руководители**

Груздев Денис Сергеевич
кандидат биологических наук

Равин Николай Викторович
доктор биологических наук, профессор

**Официальные
оппоненты**

Степанов Алексей Львович
доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова», факультет почвоведения, заведующий кафедрой биологии почв

Грабович Маргарита Юрьевна
доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», медико-биологический факультет, кафедра биохимии и физиологии клетки, профессор

Намсараев Зоригто Баирович
кандидат биологических наук, ФГБУ "Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт", Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобных технологий, Центр геномных исследований «Курчатовский геномный центр», лаборатория синтетической биологии, начальник лаборатории

Защита диссертации состоится 18 мая 2023 года в 14:00 на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр.12, биологический факультет, аудитория 389.

Тел: 8(495)-939-35-46, электронная почта: nvkostina@mail.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале

<https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.2/2323>

Автореферат разослан «14» апреля 2023 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Костина Н.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Отличительной чертой магнитотактических бактерий (МТБ) является способность к синтезу магнетосом – кристаллов магнетита или грейгита, покрытых липопротеиновой мембраной (Uebe, Schüler, 2016). Биоминерализация магнетосом контролируется генетически магнетосомным генным кластером (МГК) (Lin et. al., 2017b). МГК содержит основные гены синтеза магнетосом, названные *mag* генами, а также группоспецифичные гены (*mad*, *man*, *mts* и др.), отвечающие за форму размер и химический состав магнетосом (Uebe, Schüler, 2016). Магнетосомы у МТБ чаще всего объединены в цепочки, что способствует пассивной ориентации бактериальных клеток вдоль силовых линий магнитного поля. Такой способ магниторецепции в совокупности с последующим движением клеток при помощи жгутиков называется магнитотаксисом (Lefevre et. al., 2011).

МТБ распространены в водных экосистемах по всему миру в зонах с пониженным содержанием кислорода или полным его отсутствием (Lefevre, Vazylinski, 2013). Кроме того, несколько исследований подтвердило наличие МТБ в заболоченных почвах (Lin et. al., 2020a). Благодаря способности к синтезу магнетосом МТБ являются важными компонентами глобального цикла железа (Lin et. al., 2014b), а также участвуют в биогеохимических циклах углерода, фосфора, азота и серы (Cox et. al., 2002). Также, МТБ обладают высоким биотехнологическим потенциалом и могут применяться, к примеру, в очистке сточных вод, лечении опухолей и магнитно-резонансной томографии (Vargas et. al., 2018).

За 60 лет изучения были получены сведения о разнообразии МТБ, их физиологии и экологии, а также о процессе биоминерализации магнетосом. Однако, многие вопросы до сих пор остаются нерешенными. В частности, не до конца определены механизмы синтеза магнетосом, а также неясными остаются вопросы возникновения и эволюции МГК. Считается, что гены синтеза магнетитовых и грейгитовых магнетосом имеют общее происхождение и наследуются преимущественно вертикально, сопровождаясь многочисленными утратами у немагнитотактических представителей (Lin et. al., 2020b; Lin et. al., 2020a). Роль горизонтального переноса в наследовании магнетосомных генов считается минимальной, в том числе и потому что не известно ни одного случая переноса МГК между МТБ из разных филумов, классов или порядков. Известно лишь несколько свидетельств таких переносов между семействами, родами и видами МТБ (Koziaeva et. al., 2019; Monteil et. al., 2018). Также считается, что гены синтеза магнетосом возникли у общего предка МТБ филумов *Nitrospirota* и *Pseudomonadota* примерно 3,2 млрд лет назад (Lin et. al., 2017a), то есть процесс синтеза магнетосом является одним из древнейших процессов на земле.

Однако, такие предположения о происхождении и эволюции МГК были сделаны к моменту начала этой работы, в 2018 г., когда было известно всего 60 геномов МТБ, принадлежащих к шести филумам: *Pseudomonadota*, *Thermodesulfobacteriota*, *Nitrospirota*, *Omnitrophota*, *Planctomycetota* и *Latescibacterota* (Lin et. al., 2017b). Наиболее изученными были МТБ из филумов

Pseudomonadota и *Thermodesulfobacteriota*. К данным филумам относилось больше половины известных геномов МТБ (Lefevre, Bazyliński, 2013), тогда как в филумах *Planctomycetota* и *Latescibacterota* было известно всего 2 генома, которые были детектированы в открытых базах данных (Lin et. al., 2017b). Это дало основания полагать, что разнообразие МТБ намного больше, чем было известно. Увеличение числа представителей МТБ, принадлежащих к новым таксономическим группам, может помочь в решении вопросов биоминерализации и эволюции МТБ, а также расширить возможности их биотехнологического применения.

Цель и задачи. Целью настоящей работы являлось исследование разнообразия и эволюции магнитотактических бактерий с использованием подходов сравнительной и функциональной геномики.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Поиск геномов МТБ в открытых базах данных
2. Реконструкция геномов МТБ из метагеномов открытых баз данных
3. Реконструкция и анализ геномов МТБ из озера Белое Бордуковское и болотной почвы Дурыкинского оврага
4. Сравнительный анализ генов синтеза магнетосом и изучение их эволюционных путей

Научная новизна. Предложен новый способ детекции генов синтеза магнетосом в открытых геномных и метагеномных базах данных. Расширены представления о разнообразии, физиологии и экологии МТБ. Впервые идентифицированы представители МТБ в филумах *Elusimicrobiota*, *Hydrogenedentota* и *Nitrospirota*. Описаны новые виды-кандидаты: *Ca. Magnetominusculus linsii* филума *Nitrospirota*, *Ca. Belliniella magnetica* филума *Thermodesulfobacteriota*, *Ca. Obscuribacterium magneticum* и *Ca. Liberimonas magnetica* филума *Elusimicrobiota*. Впервые были детектированы *man* гены в магнетосомных генных кластерах филума *Thermodesulfobacteriota*. Была показана возможность межфилумного горизонтального переноса генов синтеза магнетосом. Были обнаружены новые гены, участвующие в синтезе магнетосом. Впервые были предсказаны наличие ферментативного метаболизма у МТБ, отсутствие генов синтеза жгутиков и способность к осуществлению движения по типу сокращения и скольжения.

Теоретическая и практическая значимость. Предложенный подход для поиска геномов МТБ в геномных и метагеномных данных может быть использован в исследовании разнообразия МТБ. Реконструированные геномы МТБ могут быть использованы для анализа их метаболических путей с целью получения чистых культур - продуцентов магнетосом. Детектированные МГК могут использоваться для создания продуцентов магнетосом методами синтетической биологии. Детекция межфилумного горизонтального переноса магнетосомных генов может стать основой для работ по переносу МГК в геномы немагнитотактических бактерий.

Методология и методы исследования. В работе были использованы традиционные и современные методы и подходы молекулярной и микробиологии. Сепарация МТБ проводилась методом «МТВ-CoSe» в лабораторных условиях. Исследование морфологии МТБ проводилось при помощи электронной микроскопии. Состав микробного сообщества был исследован методами секвенирования генов 16S рРНК (Illumina MiSeq), ПЦР в реальном времени и метагеномного секвенирования тотальной ДНК микробного сообщества (DNBSEQ (MGI) и Oxford Nanopore Technologies). Полученные результаты подвергались биоинформатической и статистической обработке.

Положения, выносимые на защиту.

1. Некоторые представители филумов *Elusimicrobiota*, *Hydrogenedentota* и *Nitrospinota* могут быть МТБ.
2. В геномах МТБ филума *Elusimicrobiota* имеются гены пилей IV типа, обеспечивающих поверхностно-ассоциированное движение, и отсутствуют характерные для МТБ гены жгутикового аппарата.
3. Магнетосомные гены могут переноситься горизонтально между МТБ разных филумов.

Степень достоверности и апробация результатов. Полученные в диссертации результаты являются оригинальными, их достоверность определяется большим объемом полученных данных, использованием традиционных и современных методов и подходов, корректном использовании биоинформатических методов. Кроме того, достоверность результатов подтверждается публикациями в рецензируемых высокорейтинговых международных журналах, депонированием геномных и метагеномных данных в базу данных NCBI.

Результаты диссертации были представлены на следующих российских и международных конференциях: 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria, Канадзава, Япония, 2018; VIII Международная Школа молодых учёных по молекулярной генетике «Генетическая организация и молекулярные механизмы функционирования живых систем». Звенигород, Россия, 2018; 8th Congress of European Microbiologists FEMS2019. Глазго, Великобритания., 2019; Летняя школа по биоинформатике, онлайн, 2020; 2-й и 3-й Российский микробиологический конгресс. Саранск 2019, Псков 2021, Россия.

Личный вклад автора. Личный вклад автора состоял в разработке и проведении экспериментальных работ, обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке текстов и иллюстраций для публикаций. Все этапы работы выполнялись лично автором или при его непосредственном участии.

Публикации. Материалы работы содержатся в девяти печатных работах: трех экспериментальных статьях, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science и Scopus) и шести тезисах конференций. В работах, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Объем и структура работы. Работа состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка сокращений и приложений, изложенных на 155 страницах, включая 5 таблиц, 32 рисунка и списка литературы из 245 наименований, из которых 9 на русском и 236 на английском языке.

Благодарности. Автор выражает признательность сотрудникам группы ЦКП «Биоинженерия» Козяевой В.В., Дзюба М.В., Колгановой Т.В., Сухачевой М.В., Баслерову Р.В., Патутиной Е.О. за помощь в выполнении работы. Также, автор благодарит Давидовича Г.Н., Ильичева И.И. и Чекина М.Р. за помощь в проведении просвечивающей электронной микроскопии. Автор также выражает благодарность Марданову А.В. и Кадникову В.В. за помощь в проведении секвенирования по технологии Oxford Nanopore, Кирилловой Н.П. и Смирновой И.Е. за предоставление почвенных карт УОПЭЦ «Чашниково», Алексеевой Л.М. за помощь в создании базы магнетосомных белков и отборе образцов, Круткиной М.С. за помощь в биоинформатической обработке данных. Автор благодарит Кочиеву Е.З. за ценные рекомендации по тексту диссертации. Автор выражает глубокую благодарность научным руководителям Груздеву Д. С. и Равину Н.В. за помощь и ценные советы во время выполнения диссертационной работы.

Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-34-90116 «Аспиранты»), руководитель – Н.В. Равин).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая ценность полученных результатов.

Обзор литературы. В главе представлены имеющиеся на момент начала диссертационной работы результаты о морфологическом и таксономическом разнообразии МТБ, о механизме биоминерализации магнетосом и генах, участвующих в этом процессе, а также о происхождении и эволюции МТБ.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе были исследованы геномы и метагеномы, задепонированные в открытые базы данных NCBI и IMG до апреля 2018 года. Также, объектами исследования были магнитотактические бактерии болотной почвы Дурыкинского оврага (дер. Чашниково, Солнечногорский р-н, Московская область, 56°02'56.0"N 37°09'53.0"E). Также, в работе исследовалась тотальная ДНК магнитной фракции отобранных ранее (Koziaeva et. al., 2020) донных осадков озера Белое Бордуковское (Шатурский район, Московская область, 55°37'56"N, 39°44'38"E). Исследуемые образцы оз. Белое Бордуковское и Дурыкинского оврага были обозначены «LBB» и «DUR» соответственно.

Сепарация МТБ их микроскопирование. Сепарация МТБ проводилась с помощью метода «МТВ-CoSe» (Koziaeva et. al., 2020). Для просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) клетки обогащенной магнитной фракции наносились на специальные подложки и изучались с помощью просвечивающего

электронного микроскопа JEOL JEM-1011, оснащенного цифровой камерой и программным обеспечением Digital Micrograph (GATAN) при напряжении 80 кВ.

Выделение ДНК, секвенирование и ПЦР в реальном времени. Из образцов микрокосма «DUR», его фильтрата и обогащенной магнитной фракции выделялась ДНК с помощью набора DNeasy PowerSoil kit (Qiagen, Нидерланды). Для V3-V4 региона ампликонов гена 16S рРНК проводилось секвенирование с использованием Illumina MiSeq (Illumina, США). Полученные чтения размером 2×250 п.о. обрабатывались с помощью USEARCH v10 (Edgar, 2010). Операционные таксономические единицы с нулевым радиусом (zOTE) были созданы с помощью UNOISE3 (Edgar, 2016; Edgar, Flyvbjerg, 2015) и оценены в базе данных SILVA с использованием параметров по умолчанию (Pruesse et. al., 2012). Количественное определение бактериального компонента проводилось методом ПЦР в реальном времени с использованием праймеров Eub338F/Eub518R (Fierer et. al., 2005) и технологии SYBR Green I в ПЦР-буфере-*RB* (Синтол, Россия). Численность бактерий получали путем сравнения сигналов от исследуемых образцов со стандартной кривой, полученной путем серийных разведений стандартного образца, очищенного с помощью набора WizardSV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega, США) и затем клонированного в вектор pGEM-T (Promega, США) с целевым фрагментом ПЦР.

Метагеномное секвенирование проводилось для магнитной фракции микрокосмов «LBB» и «DUR». Были получены короткие и длинные чтения с помощью платформ DNBSEQ и Oxford Nanopore Technologies соответственно. Для получения коротких чтений, библиотеки ДНК конструировали с помощью MGIEasy universal DNA library prep. Секвенирование библиотек ДНК проводилось с помощью платформы DNBSEQ-G400 (MGI Tech, Китай), с получением коротких парных чтений длиной 150 п.о. Для получения длинных чтений, библиотеки ДНК конструировались с помощью набора NEBNext Companion Module. Секвенирование полученных библиотек проводилось на приборе MinION с использованием проточной ячейки R9.4.1 (FLO-MIN106D).

Реконструкция геномов МТБ и анализ метаболических путей. Длинные и короткие чтения использовались для получения гибридной метагеномной сборки с помощью SPAdes v3.13.0 (Bankevich et. al., 2012). При помощи программ Busybee web (Laczny et. al., 2017), MaxBin2 v2.2.7 (Wu et. al., 2016), MetaBAT2 v2.15 (Kang et. al., 2019) и MyCC (Lin, Liao, 2016) была проведена первичная реконструкция геномов. Затем, программа DAS Tool v1.1.3 (Sieber et. al., 2018), выбирала финальную консенсусную сборку. Для генома LBB01 чтения были собраны в кольцевую хромосому с помощью Unicycler v0.4.6 (Wick et. al., 2017). Качество сборок оценивалось с помощью QUAST v5.0.2 (Gurevich et. al., 2013). Полнота сборки и степень контаминации оценивались с помощью CheckM v1.2.0 (Parks et. al., 2015). Деконтаминация геномов проводилась с помощью RefineM v0.1.2 (Parks et. al., 2017). Программа GTDB-Tk v1.6.0 использовалась для определения таксономического положения бактериальных геномов с использованием баз данных GTDB r95/r202/r207 (Chaumeil et. al., 2019). Аннотация геномов проводилась при помощи PGAP v5.3 (Tatusova et. al., 2016).

Магнетосомные гены определялись первично с помощью MagCluster (Ji et al., 2022), а затем дополнительно с использованием BLASTp относительно референсных последовательностей МГК. PFAM и COG домены в белковых последовательностях МГК детектировались с помощью webMGA tool (Wu et al., 2011). Метаболический потенциал полученных геномов был реконструирован на основании KEGG (Kanehisa, Sato, 2020) и DRAM (Shaffer et al., 2020). Кластеризация рассчитывалась с помощью Python библиотеки scipy v1.8.1.

Филогенетический анализ и расчет геномных индексов. Программа GTDB-Tk v1.6.0 использовалась для получения конкатенированных последовательностей 120-ти однокопийных маркерных белков бактериальных геномов (Chaumeil et al., 2019). Выравнивание последовательностей магнетосомных белков проводилось с помощью MAFFT (Kato, Standley, 2013). Конкатенированные последовательности магнетосомных белков были получены с помощью PhyloSuite v1.2.2 (Zhang et al., 2019). Филогенетические деревья были построены с помощью IQ-TREE v1.6.12 (Nguyen et al., 2015) с использованием алгоритма максимального правдоподобия и эволюционных моделей, выбранных ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017). Расчет поддержки ветвей (bootstrap) проводился с помощью UFBoot2 (Hoang et al., 2018). Деревья были визуализированы с помощью iTOL v6.5.4 (Letunic, Bork, 2021). Деревья 120-ти однокопийных маркерных белков были укоренены на *Fusobacteriota* (Coleman et al., 2021). Деревья, основанные на последовательностях магнетосомных белков, были укоренены в среднюю точку.

Средняя нуклеотидная идентичность (ANI) была рассчитана при помощи FastANI v1.33 (Jain et al., 2018), а средняя аминокислотная идентичность (AAI) – с помощью CompareM v0.1.2 (<https://github.com/dparks1134/CompareM>). Значения цифровой ДНК-ДНК гибридизации (dDDH) рассчитывались с помощью онлайн-сервиса Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) 2.1 (Meier-Kolthoff et al., 2013). Попарный процент консервативных белков (POCP) был определен с помощью скрипта runPOCP.sh (Pantiukh, Grouzdev, 2017), который был основан на описанном ранее подходе (Qin et al., 2014).

Реконсиляция. Эволюция магнетосомных генов изучалась путем согласования (реконсиляции) дерева конкатенированных последовательностей белков МГК с деревом последовательностей 120-ти однокопийных маркерных белков (Duchemin et al., 2018). Для этого использовались программы Notung v2.9 (Stolzer et al., 2012) и Ranger-DTL v2.0 (Bansal et al., 2018). На основе данных, полученных из двух программ, была рассчитана суммарная вероятность каждого изучаемого эволюционного события.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ МТБ В ОТКРЫТЫХ БАЗАХ ДАННЫХ

Поиск генов биоминерализации магнетосом в открытых базах данных

Детекция геномов МТБ в открытых базах данных NCBI и IMG проводилась на основании поиска в них магнетосомных генов. В качестве референсов для

поиска использовались известные последовательности магнетосомных белков. Для этого была создана база данных белковых последовательностей 67-ми МГК из филумов *Pseudomonadota*, *Nitrospirota*, *Omnitrophota*, *Latescibacterota* и *Planctomycetota*, известных на апрель 2018 года. Последовательности девяти основных Mam белков (MamA, -B, -M, -K, -P, -Q, -E, -O, -I), использовались для поиска МГК в геномных данных баз NCBI и IMG. В результате, было обнаружено четыре новых генома, содержащих магнетосомные генные кластеры.

Для поиска магнетосомных генов в метагеномных данных, из девяти основных Mam белков выбирался один с наиболее высокой идентичностью между его последовательностями из разных филумов и с наиболее высоким отличием идентичности и -ln e-value от гомологичных ему последовательностей, присутствующих у не-МТБ. В результате, наиболее подходящими оказались последовательности MamK, которые далее использовались в качестве референсов для поиска МГК в 10587 метагеномах из базы данных IMG. Анализ выявил 2798 последовательностей, потенциально относящихся к MamK. Скаффолды этих последовательностей проверялись на наличие в них других последовательностей Mam белков. После проверки было получено 227 последовательностей MamK из 135 метагеномов. Эти и ранее известные последовательности MamK были использованы для построения филогенетического дерева (Рис. 1), анализ которого показал, что обнаруженные последовательности MamK не кластеризовались близко с ранее известными последовательностями. Такой результат позволил предположить, что идентифицированные последовательности MamK могут относиться к таксономическим группам, в которых МТБ ранее не встречались.

Реконструкция геномов, филогенетический анализ и детекция МГК

Для метагеномов, в которых были обнаружены последовательности MamK, проводилась реконструкция геномов. В результате, было получено 14688 геномов (metagenome-assembled genome, MAG). Из них, 140 содержали ранее обнаруженные последовательности MamK. После деконтаминации было получено 34 генома МТБ, соответствовавших критериям репрезентативных геномов (Bowers et. al., 2017; Parks et. al., 2018): полнота сборки $\geq 50\%$ и контаминация $< 5\%$. Для них и полученных ранее четырех геномов МТБ из геномных данных далее проводилось определение их филогенетического положения. В результате, впервые была выявлена принадлежность МТБ к филумам *Elusimicrobiota*, *Hydrogenedentota* и *Nitrospinota* (Рис. 2). В МГК филумов *Elusimicrobiota* и *Hydrogenedentota* были обнаружены только *tam* гены, а в МГК филума *Nitrospinota* – *tam* и *mms* гены.

К филуму *Pseudomonadota* принадлежало 13 геномов. Из них, шесть геномов относились к разным семействам класса *Alphaproteobacteria*. МГК исследуемых геномов состояли из *tam* и *mms* генов. К классу *Magnetococcia* принадлежал один геном, который содержал стандартный набор магнетосомных генов, присущий МТБ этого класса. Таким образом, к этим двум классам принадлежало относительно небольшое число реконструированных геномов,

● Bootstrap > 75%

- *Omnitrophota*
- *Nitrospirota*
- *Thermodesulfobacteriota*
- SAR324
- *Zetaproteobacteria*
- *Gamma*proteobacteria
- *Magnetococcia*
- *Alphaproteobacteria*
- Геномные данные
- Метагеномные данные

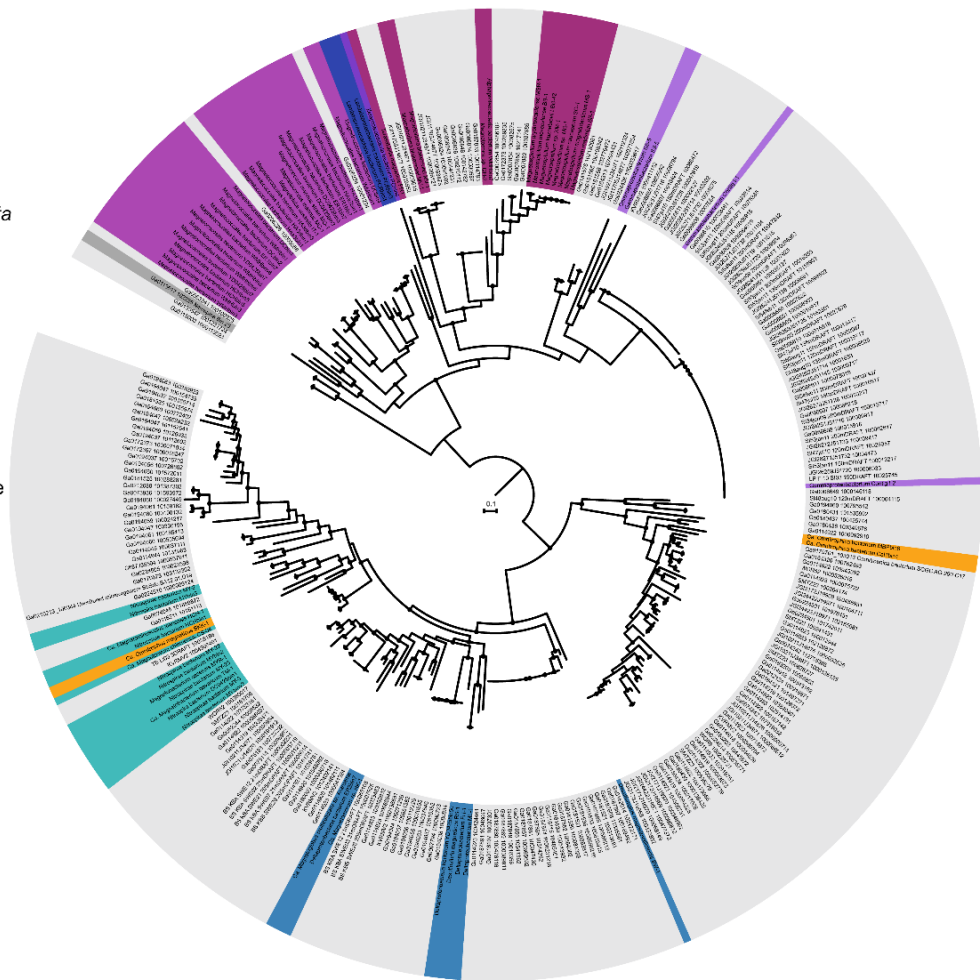


Рисунок 1. Результаты поиска MamK в базе данных IMG. Филогенетическое дерево построено методом максимального правдоподобия. Эволюционная модель - LG+I+G4. Достоверность ветвления (bootstrap) указана на основании анализа 1000 альтернативных деревьев. Масштабная линейка - 0.1 аминокислотных замен на позицию.

тогда как принято считать, что представители этих классов доминируют среди МТБ во всех природных местообитаниях (Lin et. al., 2017b). Еще шесть геномов принадлежали классу *Gamma*proteobacteria. В их МГК были обнаружены только *tam* гены. Пять геномов принадлежали филумам *Nitrospirota*, *Planctomycetota* и *Omnitrophota*. Их МГК содержали *tam*, *mad* и *man* гены, характерные для МТБ этих филумов. К филуму *Thermodesulfobacteriota* принадлежало 14 реконструированных геномов. В их МГК, кроме *tam* и *mad* генов, характерных для МТБ этого филума, впервые были обнаружены *man* гены. Ранее *man* гены были детектированы только у МТБ филума *Nitrospirota*. Поэтому, способ наследования МГК, содержащих *man* гены у МТБ из разных филогенетических групп требует дальнейшего изучения.

Исследование эволюционных путей генов синтеза магнетосом

Для анализа эволюционных путей генов синтеза магнетосом сравнивалось положение МТБ на двух деревьях: основанном на последовательностях 120-ти однокопийных маркерных белков геномов («видовое дерево», Рис. 3А) и

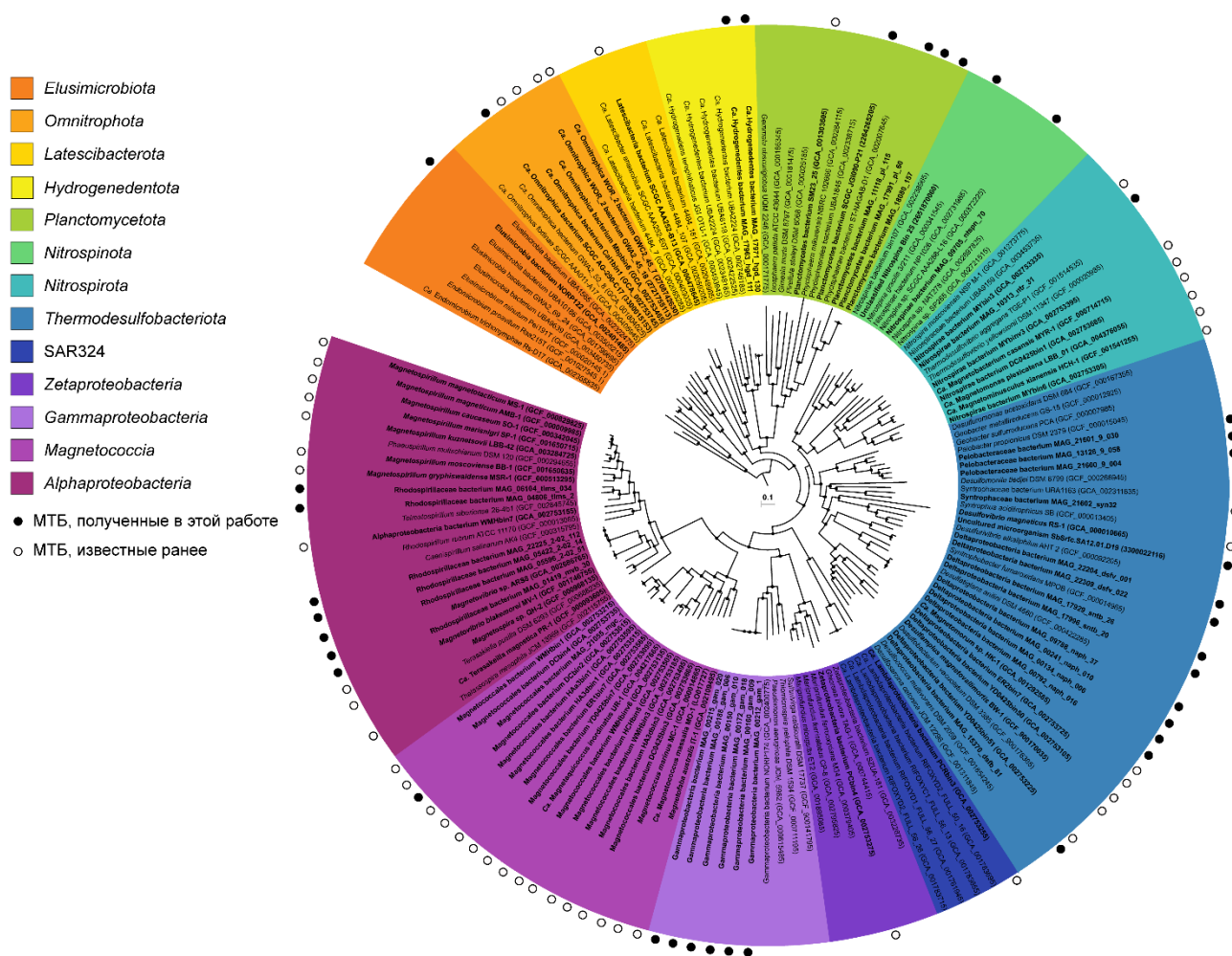


Рисунок 2. Филогенетическое дерево геномов МТБ, основанное на последовательностях 120-ти однокопийных маркерных белков. Дерево реконструировано методом максимального правдоподобия с помощью эволюционной модели LG+F+I+G4. Достоверность ветвления (bootstrap, в узлах ветвей = 100 %) указана на основании анализа 1000 альтернативных деревьев. Масштабная линейка представляет собой 0.1 аминокислотных замен на позицию.

на дереве конкатенированных последовательностей магнетосомных белков («магнетосомное дерево», Рис. 3Б). В результате было выявлено несколько случаев неконгруэнтного положения МТБ, причиной которых могли быть горизонтальные переносы магнетосомных генов. Например, филум *Thermodesulfobacteriota* на магнетосомном дереве был разделен на три подгруппы. В первую подгруппу вошли представители, способные к предполагаемому синтезу грейгитовых магнетосом, а в две другие - представители с МГК для синтеза магнетитовых магнетосом. Одна из магнетитовых подгрупп включала представителей семейств *Pelobacteraceae*, *Syntrophia* и *Desulfurivibrionaceae*, в МГК которых были детектированы *mag* гены. Эти МТБ на магнетосомном дереве группировались с представителями филума *Nitrospirota*, тогда как на видовом – с другими представителями *Thermodesulfobacteriota*

Для реконструированных в этой работе геномов МТБ был предсказан химический состав их магнетосом. Предсказание проводилось с использованием метода главных компонент для матрицы филогенетических расстояний конкатенированных последовательностей шести основных Mat белков (MatA,

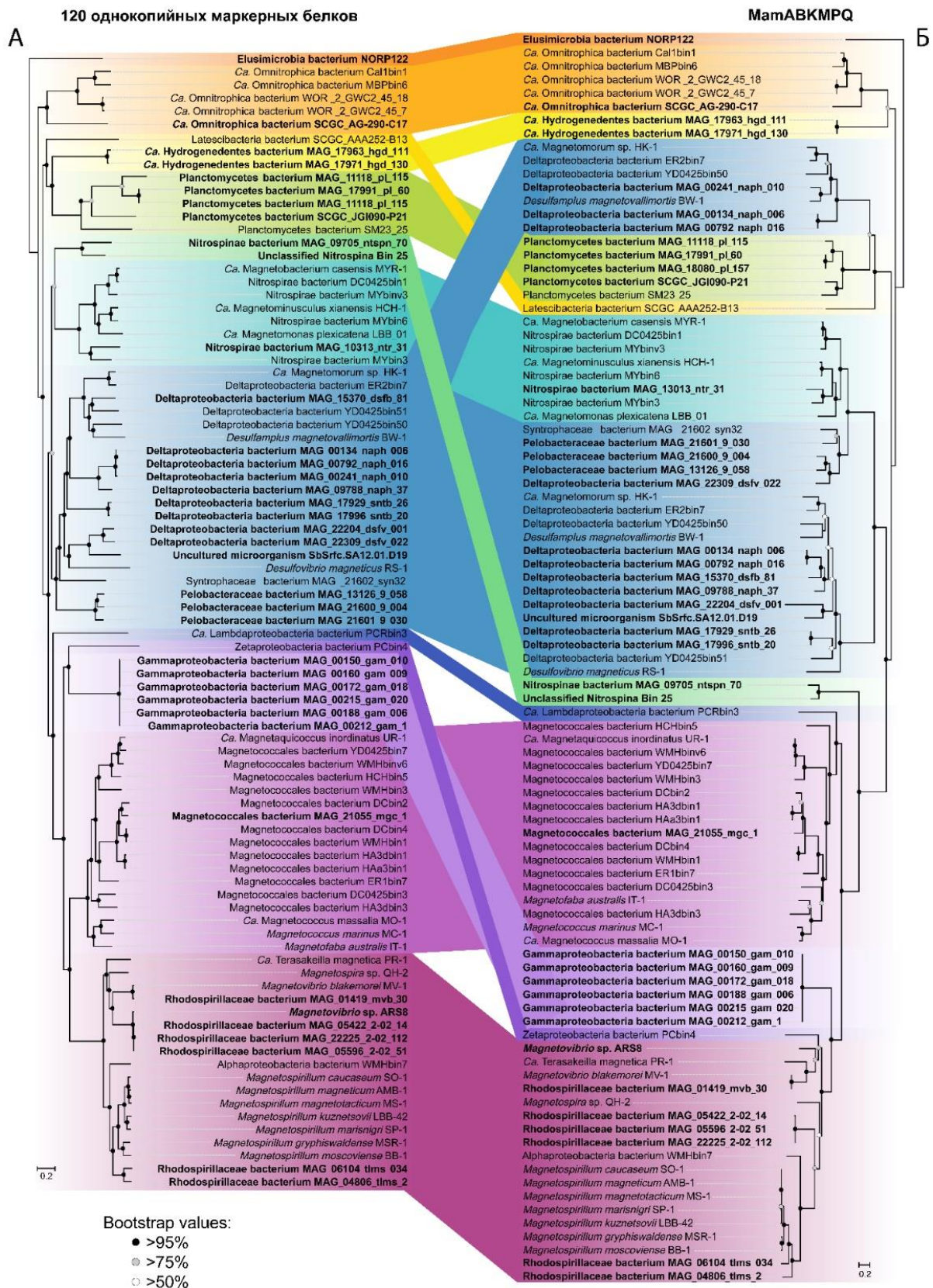


Рисунок 3. Видовое (А) и магнетосомное (Б) филогенетические деревья представителей МТБ. Геномы МТБ, полученные в данной работе, выделены жирным. Эволюционная модель - LG+F+I+G4. Достоверность ветвления (bootstrap) указана на основании анализа 1000 альтернативных деревьев. Масштабная линейка – 0.2 аминокислотных замены на позицию. Цветным фоном обозначена принадлежность МТБ к разным филумам, легенда к цветам представлена на Рис.2.

-В, -К, -М, -Р и - Q) (Рис. 4). В результате было выявлено, что представители филумов *Elusimicrobiota* и *Hydrogenedentota*, вероятнее всего, синтезируют магнетосомы грейгитового состава, а *Nitrospinota* – магнетитового.

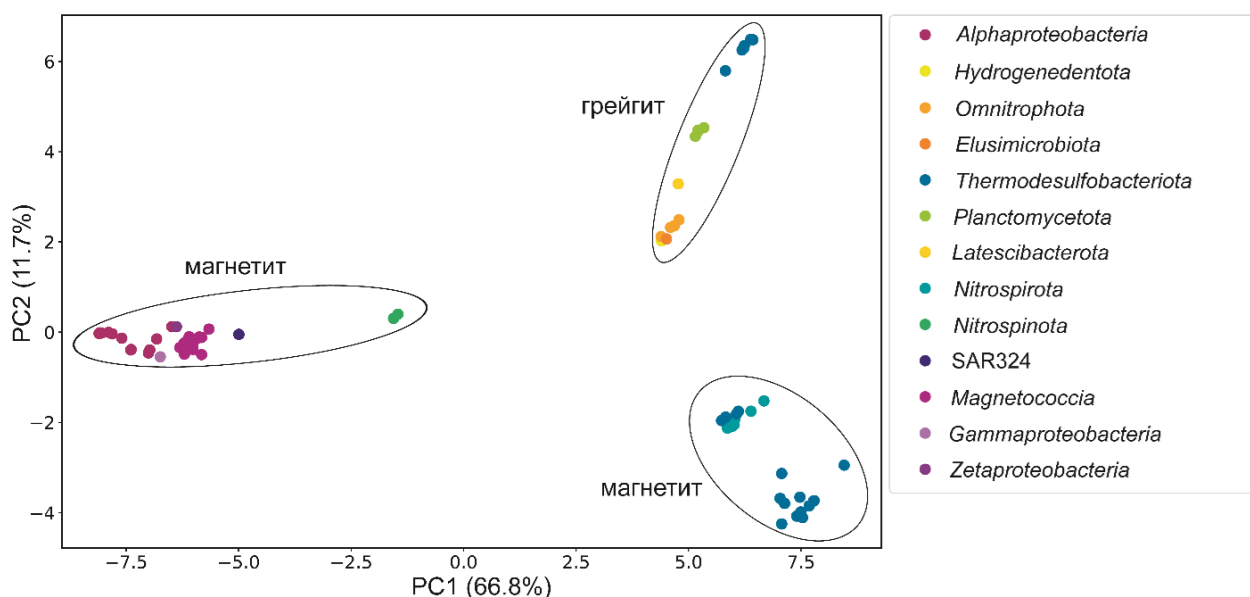


Рисунок 4. Предсказание химического состава магнетосом для реконструированных геномов.

Таким образом, данная работа представляет собой первый крупномасштабный поиск генов биоминерализации магнетосом в открытых базах данных. Новые данные значительно расширили представления о разнообразии и экологии МТБ. Кроме того, неконгруэнтность положения МТБ на видовом и магнетосомном деревьях позволяет предположить, что горизонтальные переносы магнетосомных генов происходят гораздо чаще, чем считалось ранее, и имеют большое значение в наследовании и эволюции МГК.

ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ И ЭВОЛЮЦИИ МТБ

ОЗЕРА БЕЛОЕ БОРДУКОВСКОЕ

Реконструкция геномов МТБ из озера Белое Бордуковское и их филогенетический анализ

Клетки МТБ из микрокосма «LBB» были получены и описаны ранее (Koziaeva et. al., 2020). В этой работе проводилось метагеномное секвенирование их ДНК и реконструкция геномов. В результате было получено 115 589 666 (2×150 п.о.) коротких парных чтений (14,9 Гб) и 304 996 длинных чтений (2,1 Гб). Биоинформатический анализ полученных данных позволил реконструировать три генома МТБ. В полученных геномах были обнаружены последовательности 16S рРНК, что помогло связать геномные данные с морфологией клеток МТБ, обозначенных как LBB01, LBB02 и LBB04 в предыдущей работе (Koziaeva et. al., 2020). Для ранее описанного *Sa. Magnetomonas plexicatena* LBB01 (Koziaeva et. al., 2020) в этой работе была получена кольцевая хромосомная сборка, длиной 3,27 млн п.о. с GC составом 42,0 %. Также, для LBB02 был получен геном с полнотой сборки – 91,5 %, размером 3,47 Мб и GC составом 47,0 %. Для LBB04 был получен геном с полнотой сборки 60.1 %, длиной 4,49 п.о. и GC составом

50,5%. Согласно GTDB, реконструированные геномы LBB01 и LBB02 были отнесены к семейству *Ca. Magnetobacteriaceae* филума *Nitrospirota*, тогда как LBB04 был отнесен к порядку *Syntrophales* филума *Thermodesulfobacteriota*.

Согласно видовому дереву (Рис. 5), все известные геномы МТБ семейства *Ca. Magnetobacteriaceae*, формировали пять клад, вероятно, соответствующие пяти родам. Для подтверждения результатов филогенетического анализа были рассчитаны геномные индексы. Средние значения ААI внутри ранее обозначенных родов варьировались от 75 до 100%, а значения между ними - от 55 до 62%. Учитывая характер ветвлений филогеномного дерева и значения ААI, LBB02 был отнесен к роду *Ca. Magnetominusculus*. Значения РОСР между геномами одной и той же клады составляли около 60% или выше, что подтверждает выводы, сделанные на основе филогенетического анализа и анализа ААI. Для определения таксономического положения исследуемых геномов на уровне видов были рассчитаны значения индексов ANI и dDDH. В результате, значения этих индексов для LBB02 с близкородственными геномами были ниже порога разделения видов (<95-96% и <70% соответственно) (Auch et. al., 2010; Goris et. al., 2007). Такие результаты указывают на то, что LBB02 представляет собой новый вид. Поэтому, его было предложено назвать *Ca. Magnetominusculus linsii* LBB02. Геном LBB04, основываясь на результатах филогенетического анализа (Рис. 5), сходстве последовательностей 16S рРНК с ближайшими культивируемыми штаммами (<94%) и значениях ААI (<65%), был отнесен к новому роду и виду и назван *Ca. Belliniella magnetica*.

Детекция магнетосомных генов у МТБ из оз. Белое Бордуковское

В реконструированных геномах МТБ были детектированы гены синтеза магнетосом (Рис. 6). Так как для LBB01 был получен кольцевой геном, его МГК был взят в качестве референса для сравнительного анализа магнетосомных генных кластеров, содержащих *man* гены. МГК у *Ca. Magnetomonas plexicatena* LBB01 состоял из трех регионов, расположенных в трех отдельных хромосомных локусах. Основной регион МГК (22 Кб) включал в себя гены *mad26*, *mad25*, *mad24*, *mad23*, *manO-Cter*, *man6*, *man5*, *man4*, *manQ*, *manE*, *manI*, *manA*, *mad2*, *manB*, *manQ-2*, *mad31*, *manM*, *manP*, *man3*, *mad10*, *man2*, *manK*, *man1*. Второй регион (2,7 Кб), расположенный на расстоянии 276,8 Кб от основного региона, содержал гены *feoA* и *feoB*. Третий участок (2,6 Кб), расположенный на расстоянии 1,7 Мб от второго, состоял из генов *mad28*, *mad29* и гена, кодирующего гипотетический белок. МГК *Ca. Magnetominusculus linsii* LBB02 также включал три региона с содержанием генов, сходным с МГК *Ca. Magnetomonas plexicatena* LBB01, за исключением гена *mad26*, расположенного в другом контиге. Более того, генный контент и синтения основного региона, сходны не только у LBB01 и LBB02, но также и у всех известных МГК из филума *Nitrospirota* (Рис. 6). МГК LBB04 содержал лишь часть генов, присутствующих в LBB01. Однако, в нем были обнаружены гены *man2* и *man3*, ранее считавшиеся специфичными только для МТБ филума *Nitrospirota*. Таким образом, в геномах МТБ филума *Thermodesulfobacteriota*, полученных из открытых баз данных и из оз. Белое Бордуковское были независимо детектированы *man* гены.

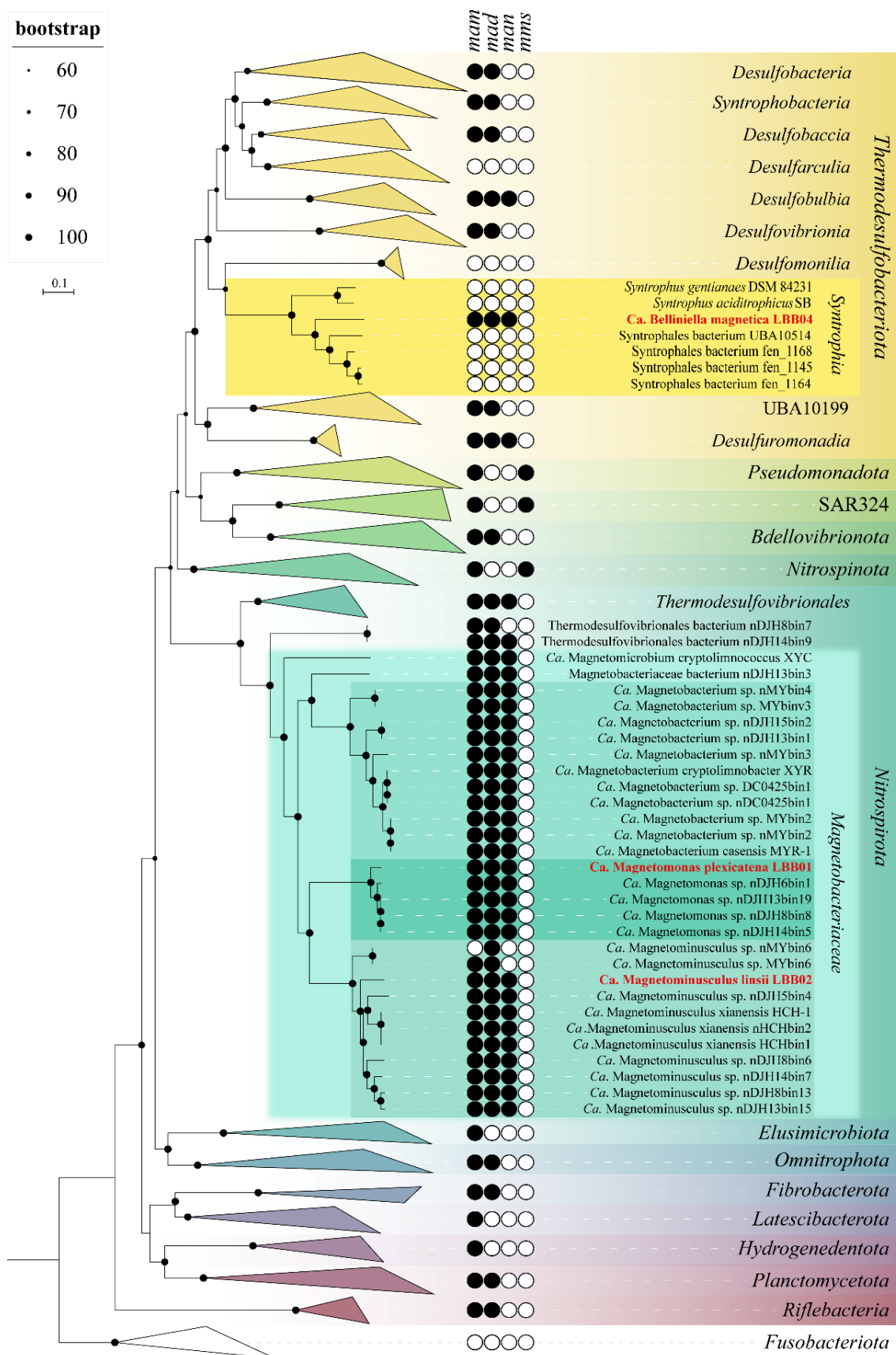


Рисунок 5. Видовое дерево, построенное методом максимального правдоподобия для ранее известных, полученных в этой работе геномов МТБ из оз. Белое Бордуковское (выделены красным) и их ближайших немагнитотактических представителей. Эволюционная модель - LG+F+I+G4. Достоверность ветвления (bootstrap) указана на основании анализа 1000 альтернативных деревьев. Масштабная линейка – 0.1 аминокислотных замены на позицию.

Исследование эволюционных путей у МГК, содержащих *man* гены

Чтобы понять как наследовались МГК, содержащие *man* гены, изначально было построено видовое дерево всех представителей филумов *Nitrospirota* и *Thermodesulfobacteriota* (Рис. 7). Согласно топологии этого дерева, все *man*-содержащие МГБ были разделены на три филогенетические группы: *Dissulfurispiraceae*, *Magnetobacteriaceae* и группу *man*-содержащих *Thermodesulfobacteriota*. Затем были построены филогенетические деревья для последовательностей каждого магнетосомного белка основной части МГК филума *Nitrospirota* и их конкатенированных последовательностей. На основании построенных деревьев при помощи программ Ranger-DTL и Notung проводилась реконсиляция - аннотирование магнетосомных деревьев эволюционными событиями и последующим отображением этих событий на видовом дереве. В результате, было показано, что в 90,9 % случаев (20 из 22 реконсиляций деревьев магнетосомных белков) по Notung и в 95,5 % (21 из 22 деревьев) по Ranger-DTL, магнетосомные гены передавались горизонтально от группы *Magnetobacteriaceae* к общему предку группы *Dissulfurispiraceae* (Рис. 7). Затем этот МГК, согласно результатам реконсиляции, наследовался вертикально у всех представителей *Dissulfurispiraceae* и, в конечном итоге, был утрачен у немагнитотактических представителей.

Кроме того, результаты реконсиляции показали, что МГК в группе *Magnetobacteriaceae* были приобретены с помощью горизонтального переноса генов (ГПГ) в 54,5% случаев (12 из 22 деревьев) по Ranger-DTL и в 59% (13 из 22 деревьев) по Notung. Из всех случаев ГПГ, наиболее частыми были переносы из филума *Thermodesulfobacteriota*, на долю которых приходилось 46,2% (6 из 13 деревьев) по Ranger-DTL и 69,2% (9 из 13 деревьев) по Notung. Переносы из других филумов (*Bdellovibrionota*, *Riflebacteria*, *Planctomycetota*, *Omnitrophota*) имели меньшую вероятность.

Также, было показано, что МГК у *man*-содержащих *Thermodesulfobacteriota* были приобретены горизонтально с вероятностью 100,0% (19 из 19 деревьев) по Ranger-DTL и 94,7% (18 из 19 деревьев) по Notung. При этом, МГК в эту группу были перенесены из группы *Magnetobacteriaceae* с вероятностью 73,6% (14 из 19 деревьев) по Ranger-DTL и 52,6% (10 из 19 деревьев) по Notung. Поскольку горизонтальный перенос генов МГК был независимо обнаружен от группы *Magnetobacteriaceae* к группе *Thermodesulfobacteriota* и наоборот, вероятность того, что между этими двумя группами действительно происходил ГПГ магнетосомных генов очень велика (Рис. 7). Однако для уточнения того, какая из групп служила донором МГК, а какая реципиентом, требуется больше данных о *man*-содержащих МГБ.

Таким образом, в данной работе был детектирован первый случай межфилумного горизонтального переноса магнетосомных генов. При этом, исследуемые МГБ были получены из одного источника, озера Белое Бордуковское, магнетосомы у этих бактерий из разных филумов имеют одинаковую форму и размер (Koziaeva et. al., 2020), а их МГК обладают высокой



← *mat* гены ← *man* гены ← *mad* гены ← метаболитизм железа ← гипотетический белок

Рисунок 6. Сравнение МГК в геномах МТБ из филумов *Nitrospirota* и *Thermodesulfobacteriota*. Геномы, полученные в этой работе выделены красным.

консервативностью (Рис. 6). Все эти данные свидетельствуют в пользу недавнего горизонтального переноса генов синтеза магнетосом.

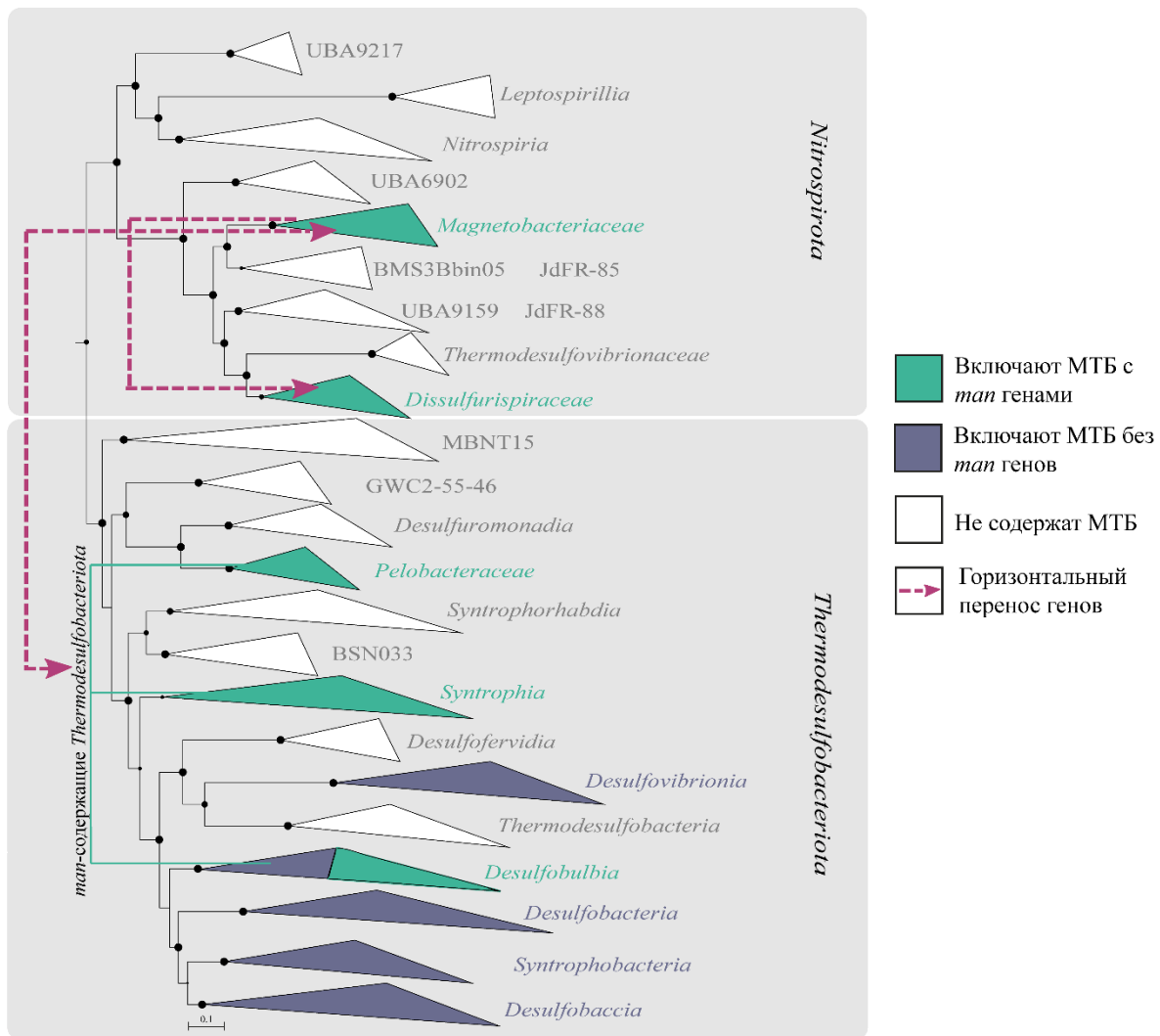


Рисунок 7. Результаты реконструкции геномов филумов *Nitrospirota* и *Thermodesulfobacteriota*, содержащих *man* гены. Филогенетическое дерево было построено методом максимального правдоподобия. Эволюционная модель - LG+F+I+G4. Достоверность ветвления (bootstrap) указана на основании анализа 1000 альтернативных деревьев. Масштабная линейка – 0.1 аминокислотных замен на позицию.

Обнаружение межфилумного ГПГ магнетосомных генов ставит под вопрос древность происхождения генов синтеза магнетосом, поскольку в филумах, считающихся древними МГК могли быть получены в более поздние эволюционные периоды, чем появились сами филумы. Несмотря на то, что период возникновения МГК не может быть определен на основе доступных данных, результаты этой работы позволяют предположить, что МГК мог возникнуть уже после появления филумов *Nitrospirota* и *Pseudomonadota*, так как по крайней мере один из этих филумов приобрел МГК горизонтально. Это означает, что происхождение МГК может быть датировано более поздним временем, чем предполагаемый ранее период среднего архейского эона (Lin et. al., 2017a). Возможность межфилумных переносов МГК следует учитывать при дальнейшем построении гипотез об эволюции МТБ.

ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ МТБ БОЛОТНОЙ ПОЧВЫ ДУРЫКИНСКОГО ОВРАГА

Таксономическая структура и численность микробного сообщества Дурыкинского оврага до и после магнитного обогащения

В работе анализировался состав микробного сообщества болотной низинной (типичной) торфяно-глеевой почвы (Kirillova et. al., 2015) Дурыкинского оврага в исходном образце почвенного микрокосма (П), после его фильтрации (Ф) и магнитного обогащения (М). В результате, после магнитного обогащения значительно увеличилось обилие некоторых минорных филумов почвенного сообщества. Так, относительное обилие представителей филума *Omnitrophota* возросло в 272 раза (с 0,022% в П до 6,00% в М), *Elusimicrobiota* почти в 200 раз (с 0,025% до 4,814%), *Hydrogenedentota* в 12,8 раз (с 0,197% до 2,53%), а *Planctomycetota* более чем в 5 раз (с 0,81% до 4,23%) (Рис. 8). Во всех

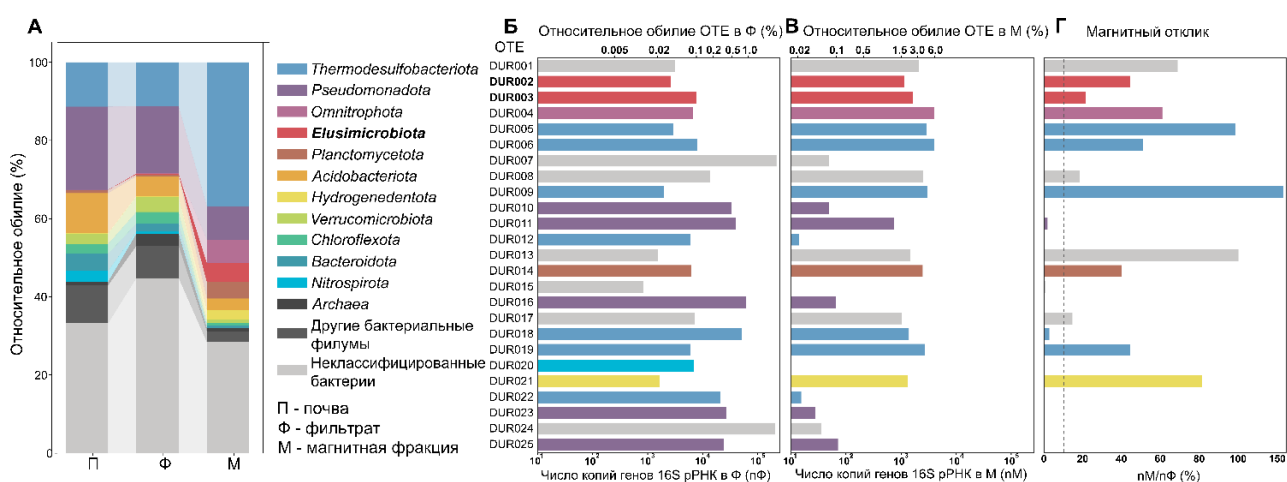


Рисунок 8. (А) Состав микробного сообщества в исходном образце почвы из микрокосма (П), после фильтрации (Ф) и после магнитного обогащения (М). (Б) Относительная численность 25 наиболее встречаемых zОТЕ в фильтрате. (В) Относительная численность 25 наиболее встречаемых zОТЕ в обогащенной магнитной фракции. (Г) Значения магнитного отклика для наиболее встречаемых zОТЕ.

трех образцах значительная часть бактериальных zОТЕ не классифицировалась на уровне филума. Доля таких zОТЕ составила 32% в сообществе П, 44% в сообществе Ф и 28% в сообществе М.

В магнитной фракции были детектированы клетки в форме вибрионов и палочек, содержащие магнетосомы пулевидной, зубовидной и каплевидной формы (Рис. 9). В отличие от большинства известных МТБ, ни в одном из детектированных морфотипов магнетосомы не были объединены в цепочки.

Количество копий генов на грамм образцов было подсчитано с помощью ПЦР в реальном времени. Полученное число копий составило в среднем $1,0 \times 10^8$, $7,3 \times 10^6$ и $6,58 \times 10^4$ копий генов (г), для сообществ П, Ф и М, соответственно. Обогащенная магнитная фракция клеток составляла приблизительно 0,07% от сообщества П и 0,9% от сообщества Ф, что делает МТБ представителями редкой биосферы (Sogin et. al., 2006). zОТЕ, численность которых увеличилась после магнитного обогащения, были детектированы путем расчета отношения числа

копий гена 16S рРНК в магнитной фракции к числу копий в фильтрате (nM/nФ) (Рис. 8 БВГ), и 25 наиболее представленных zОТЕ во всех трех образцах

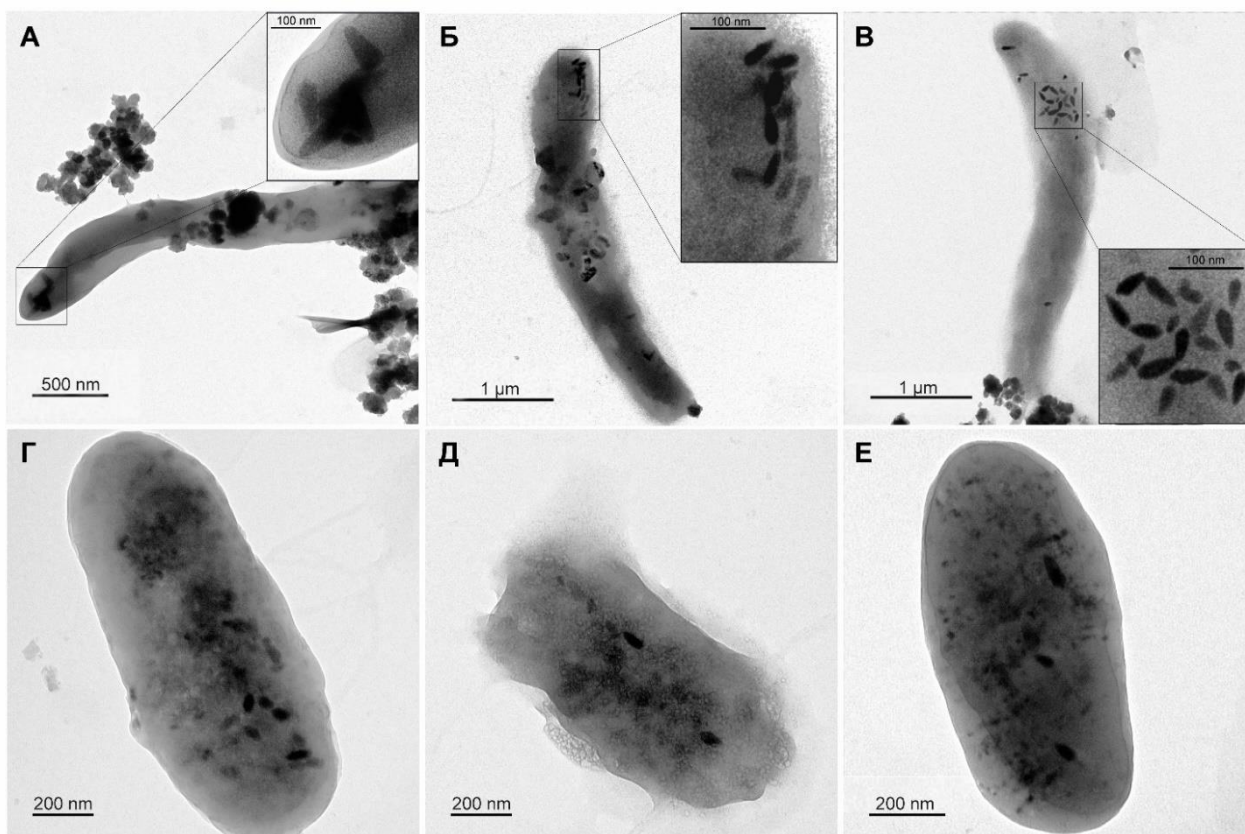


Рисунок 9. Морфология клеток обогащенной магнитной фракции. (А-В) Клетки в форме вибрионов, (Г-Е) клетки в форме палочек. Увеличенная область, в которой находятся магнетосомы, выделена черным квадратом.

были отобраны для более детального анализа. zОТЕ считалась обладающей магнитным откликом, если значение nM/nФ превышало 10%.

В результате было выявлено, что 13 zОТЕ обладали магнитным откликом. Среди них, наиболее представленными были DUR002 и DUR003, на долю которых приходилось около 4,2% всех ампликонов этого сообщества. Эти zОТЕ имели около 89% сходства с *Endomicrobium proavitum* Rsa215, культивируемым представителем филума *Elusimicrobiota*. Значительное обогащение DUR002 и DUR003 позволило предположить наличие в них магнетосом, поэтому они стали предметом дальнейшего исследования.

Реконструкция геномов МТБ и их филогенетический анализ

В результате метагеномного секвенирования обогащенной магнитной фракции было получено 106 276 479 коротких парных чтений (16,1 Гб) и 299 619 длинных чтений (2,1 Гб). После биоинформатического анализа было получено два генома МТБ, у которых последовательности 16S рРНК соответствовали zОТЕ DUR002 и DUR003. Геном DUR002, длиной 3,4 Мб, обладал полнотой сборки 94,4% и GC-составом 39,8%. Геном DUR003 имел длину 2,9 Мб, GC-состав - 52,8% и полноту сборки - 75,8%. Оба генома относились к филуму *Elusimicrobiota*, и поэтому, вместе с 217 геномами этого филума использовались для филогенетического анализа (Рис. 10).

Геном DUR002 был единственным геномом МТБ класса *Endomicrobia*. Значение AAI между DUR002 и близкородственным ему *Zod_Metabat.202* было ниже 65%, поэтому данные геномы принадлежали к разным родам (Konstantinidis et. al., 2017). Геном DUR003 принадлежал к классу *Elusimicrobia*, и на видовом дереве кластеризовался с геномами *fen_1117* и *Bin_99*. Значения AAI между этими тремя геномами были ниже 65%, поэтому они относились к трем разным родам. Основываясь на результатах филогенетического дерева и значений AAI, геномы DUR002 и DUR003 были отнесены к новым родам и видам и названы *Ca. Liberimonas magnetica* и *Ca. Obscuribacterium magneticum*, соответственно. Помимо DUR002 и DUR003, в этой работе были обнаружены еще два генома МТБ, принадлежащих к классу *Elusimicrobia*. Первый геном, NORP122, был получен из геномных данных базы NCBI. Второй, NC_groundwater_1499_Pr4_B-0.1um_52_3 (далее «1499») был детектирован после детального анализа 217 геномов филума *Elusimicrobiota*.

Изучение метаболического потенциала и предсказание типов движения у МТБ филума *Elusimicrobiota*

Полнота углеродных и энергетических путей исследовалась у 219 геномов филума *Elusimicrobiota*, включая геномы МТБ. В результате было выявлено, что DUR003, NORP122 и 1499, вероятно, обладают респираторным типом метаболизма, тогда как DUR002 является первым МТБ, обладающим метаболизмом ферментативного типа.

На основе наличия генов движения было выявлено, что геномы МТБ и большинство свободноживущих представителей филума *Elusimicrobiota* имели гены, вовлеченные в хемотаксис (Che), метил-акцепторные гены (MCP) и гены сборки пилей IV типа, что предполагает наличие подвижности по типу сокращения (twitching motility). Гены синтеза жгутиков в этих геномах обнаружены не были, что делает их уникальными среди МТБ, поскольку все другие известные представители подвижны с помощью жгутиков. Геном DUR003 также содержит гены связанной со скользящей подвижностью (gliding motility) транспортной системы GldAFG.

Вероятно, МТБ с такими типами подвижности не были обнаружены ранее, так как методы, использовавшиеся для сепарации МТБ, были основаны на активном движении клеток, обеспечиваемом жгутиками. В данной работе был использован недавно разработанный метод сепарации «МТБ-CoSe», который не зависит от активного клеточного движения и требует только присутствия магнитных частиц внутри клеток. Кроме того, разнообразие МТБ в большинстве прошлых работ изучалось с использованием проб водных экосистем, где преобладает подвижность, обусловленная жгутиками (Wadhwa, Berg, 2022). Поскольку почвы имеют твердую поверхность, для них было показано преобладание поверхностно-ассоциированных типов движения, таких как сокращение и скольжение. Поэтому магнитотаксис, связанный с поверхностно-ассоциированной подвижностью, может быть преимуществом для бактерий в почвенной среде обитания.

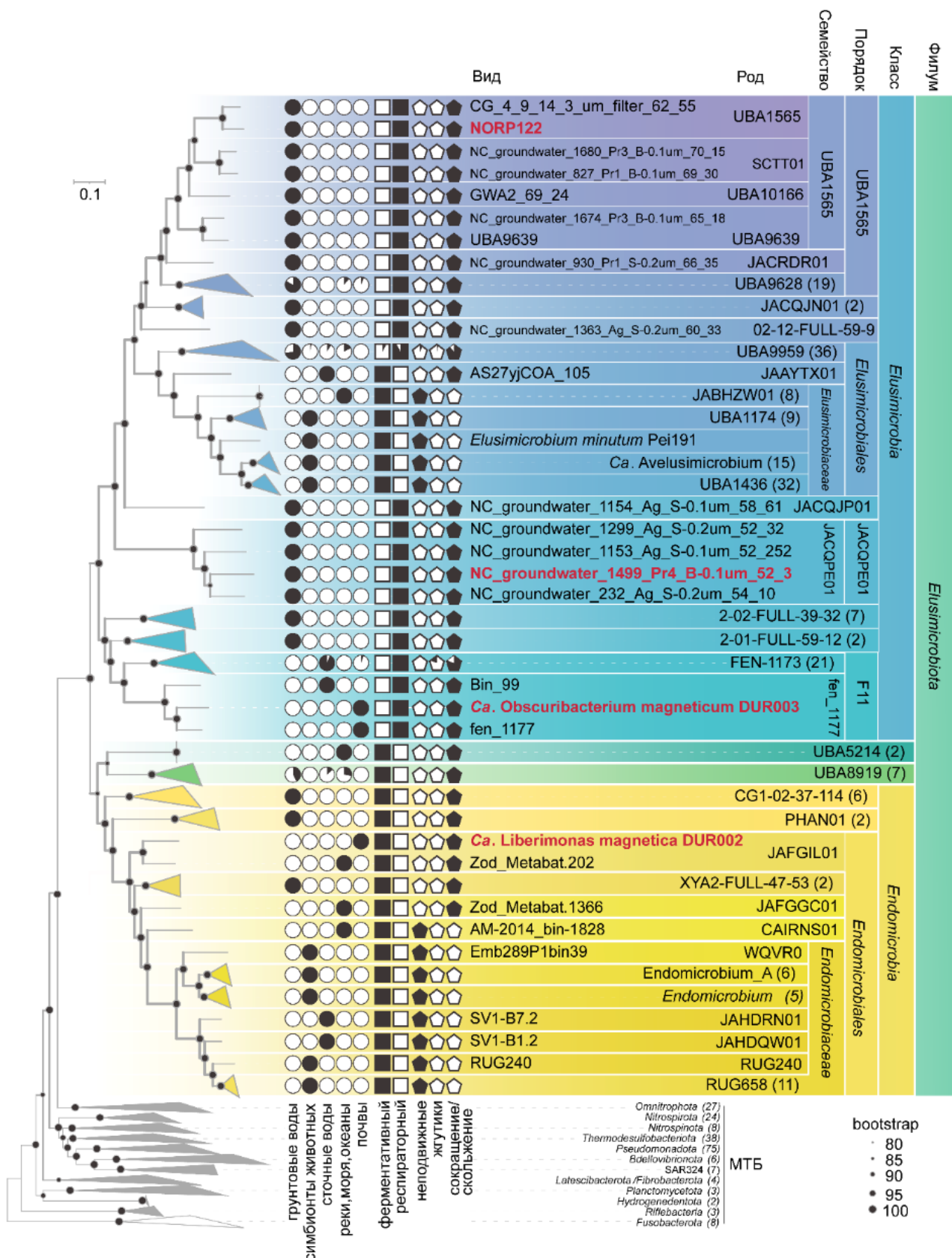


Рисунок 10. Филогенетическое дерево не-МТБ геномов *Elusimicrobiota*, а также всех геномов МТБ, известных ранее и детектированных в данной работе. Дерево было построено методом максимального правдоподобия на основании 120 однокопийных маркерных белков геномов с использованием эволюционной модели LG+F+I+G4. Достоверность ветвления (bootstrap) указана на основании анализа 1000 альтернативных деревьев. Масштабная линейка – 0,2 аминокислотных замен на позицию. Геномы, полученные в этой работе, выделены красным.

Детекция магнетосомных генных кластеров у МТБ филума *Elusimicrobiota*

В геномах МТБ филума *Elusimicrobiota* были детектированы их гены синтеза магнетосом (Рис. 11). Был выявлен сет основных *tam* генов: *tamA*, *-B*, *-M*, *-I*, *-Q*, *-E*, *-L-like*, но не было обнаружено генов сборки магнетосомной цепи (*tamK* или *mad28*) (Katzmann et. al., 2010; Lefèvre et. al., 2013). Это позволяет предположить, что магнетосомы у МТБ данного филума не образуют цепей. Помимо *tam* генов, никаких других известных (*mad*, *man*, *mms* и др.), участвующих в синтезе магнетосом, в МГК филума *Elusimicrobiota* детектировано не было. Однако, было обнаружено семь новых генов, специфичных для МГК этого филума, которые были названы *mae* генами (**m**agnetosome *E*lusimicrobiota). Более того, магнетохромные домены, участвующие в созревании кристаллов магнетосом, переводя железо из степени окисления Fe³⁺ в Fe²⁺ и наоборот (Arnoux et. al., 2014), были обнаружены только в одном из четырех изучаемых МГК, в NORP122. Отсутствие этих доменов в трех других МГК предполагает, что либо МТБ могут использовать ранее неизвестный механизм для контроля состояния железа во время синтеза магнетосом, либо магнетосомы у этих МТБ состоят не из магнетита или грейгита, а из другого минерала.

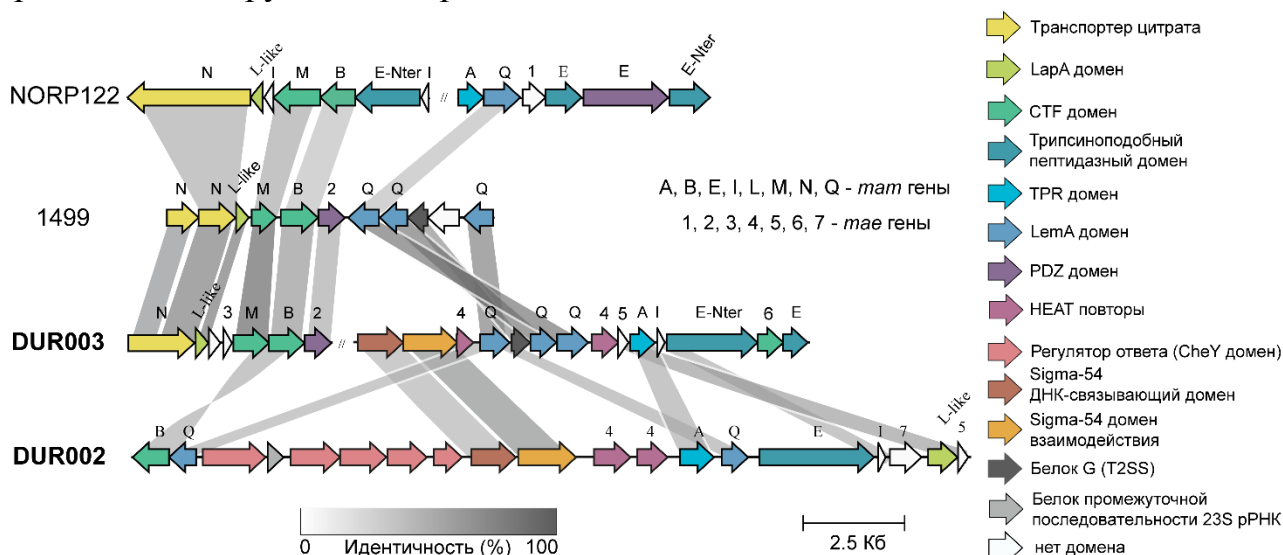


Рисунок 11. Сравнение регионов МГК в геномах МТБ филума *Elusimicrobiota*. Гены окрашены в соответствии с консервативными доменами, которые они включают.

Помимо магнетосомных, в МГК также присутствовало несколько генов, вовлеченных в процессы, не связанные с синтезом магнетосом и присутствующие как в МТБ, так и в не-МТБ геномах. Например, в МГК DUR002 были детектированы гены регуляторов ответа (response regulators), содержащие CheY-подобные домены. Ранее было показано, что белки, содержащие домены CheY участвуют в переключении направления вращения жгутикового мотора (Zhu et. al., 2010), а также в контроле частоты поворота клеток при осуществлении движения по типу сокращения (Kaimer, Zusman, 2016; Kühn et. al., 2021). Вероятно, колокализация этих генов с магнетосомными не случайна, и магнетосомы могут способствовать более эффективной смене направления при движении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на многолетнее изучение магнитотактических бактерий, их геномное разнообразие является слабоизученным, а вопросы происхождения и наследования магнетосомных генов остаются нерешенными. В настоящей работе было изучено разнообразие МТБ из открытых геномных и метагеномных баз данных и из двух природных источников. Всего было получено 43 новых генома, что существенно дополнило ранее имевшиеся данные о разнообразии МТБ. Магнетосомные гены были обнаружены в геномах бактерий, принадлежащих филумам *Elusimicrobiota*, *Hydrogenedentota* и *Nitrospirota*, где ранее представители МТБ обнаружены не были. Эти результаты позволили увеличить таксономическое разнообразие МТБ. У представителей МТБ филума *Thermodesulfobacteriota* в МГК были обнаружены *man* гены, ранее считавшиеся характерными только для МТБ филума *Nitrospirota*.

Из оз. Белое Бордуковское было реконструировано 3 генома МТБ, принадлежащих филумам *Nitrospirota* и *Thermodesulfobacteriota*. Для первой бактерии, *Ca. Magnetomonas plexicatena* LBB01, была получена кольцевая хромосомная сборка, которая была использована в качестве референсной для изучения эволюции и структурной организации МГК у МТБ филума *Nitrospirota*. Вторая бактерия, *Ca. Magnetominusculus linsii* LBB02 является первым представителем этого рода с известной клеточной морфологией и геномом высокого качества сборки. Третья бактерия, *Ca. Belliniella magnetica* LBB04, является первым видом-кандидатом филума *Thermodesulfobacteriota* с известной морфологией, обладающим *man* генами в МГК.

Для всех геномов филумов *Nitrospirota* и *Thermodesulfobacteriota*, содержащих в МГК *man* гены, была проведена реконструкция филогенетических деревьев, которая позволила впервые детектировать межфилумный перенос генов синтеза магнетосом. Кроме того, между семействами МТБ филума *Nitrospirota* также был детектирован горизонтальный перенос МГК. Полученные результаты существенно увеличивают роль горизонтального переноса генов синтеза магнетосом в эволюции магнитотактических бактерий. Более того, новые данные ставят под вопрос древность происхождения МГК: в филумах, считающихся древними, МГК мог быть унаследован путем горизонтального переноса генов в более поздние эволюционные периоды, чем появились сами филумы.

Также, в этой работе изучалось разнообразие МТБ в болотной почве – экосистеме, где разнообразие МТБ ранее практически не исследовалось. Было показано, что МТБ составляют минорную часть почвенного микробного сообщества и являются частью редкой микробной биосферы. Биоинформатический анализ метагеномных данных из обогащенной магнитной фракции позволил реконструировать два генома МТБ, относящихся к филуму *Elusimicrobiota*. Анализ МГК этих и других известных геномов МТБ этого филума позволил выявить уникальные гены, названные *mae* генами. Кроме того, в МГК отсутствовали последовательности *tamK*, а в магнетосомных белках – магнетохромные домены, что нетипично для МТБ. Геномный анализ также

показал отсутствие генов синтеза жгутиков, тогда как все ранее изученные МТБ ими обладали. МТБ филума *Elusimicrobiota*, в свою очередь, обладали генами пилей IV типа, обеспечивающих поверхностно-ассоциированное движение. Кроме того, у МТБ этого филума были детектированы гены метаболизма ферментативного типа, что ранее не встречалось среди МТБ.

Таким образом, исследование новых местообитаний и использование новых способов детекции МТБ, позволили значительно увеличить разнообразие МТБ. Это, в свою очередь, позволило подробно изучить эволюцию генов синтеза магнетосом и оценить роль горизонтального переноса генов в этом процессе. Кроме того, были получены новые данные о физиологии МТБ, поднимающие вопросы о механизмах магнитотаксиса и преимуществах ферментативного метаболизма.

ВЫВОДЫ

1. В результате поиска генов синтеза магнетосом в бактериальных геномах из баз данных NCBI и IMG впервые обнаружены МТБ в филумах *Elusimicrobiota* и *Nitrospinota*.
2. В результате поиска генов синтеза магнетосом в 10 587 метагеномах из базы данных IMG выявлено 38 новых геномов МТБ, принадлежащих 7 филумам. Впервые детектированы МТБ, представляющие филум *Hydrogenedentota*.
3. На основе данных высокопроизводительного секвенирования обогащенной магнитной фракции клеток из озера Белое Бордуковское реконструировано три генома МТБ филумов *Nitrospirota* и *Thermodesulfobacteriota*. Для бактерии *Ca. Magnetomonas plexicatena* LBB01 получена первая для МТБ филума *Nitrospirota* полная геномная последовательность. Основываясь на геномных характеристиках, бактерию LBB02 предложено отнести к новому виду-кандидату *Ca. Magnetominusculus linsii*, а LBB04 - к новому роду- и виду-кандидату *Ca. Belliniella magnetica*.
4. На основе данных высокопроизводительного секвенирования обогащенной магнитной фракции клеток из болотно-торфяной почвы реконструировано два генома МТБ филума *Elusimicrobiota*, которые предложено отнести к новым родам- и видам-кандидатам *Ca. Liberimonas magnetica* и *Ca. Obscuribacterium magneticum*. В этих геномах впервые для МТБ показано наличие генов пилей IV типа, обеспечивающих поверхностно-ассоциированное движение. В магнетосомных генных кластерах показано наличие *mae* генов и отсутствие магнетохромных доменов в магнетосомных белках.
5. В магнетосомных генных кластерах МТБ филума *Thermodesulfobacteriota* показано наличие генов *man*, ранее считавшихся специфичными только для филума *Nitrospirota*. С помощью сравнительного геномного анализа впервые предсказан горизонтальный перенос магнетосомных генов между МТБ из разных филумов (*Thermodesulfobacteriota* и *Nitrospirota*).

Список публикаций в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных WoS, SCOPUS и RSCI:

1. **Uzun M.**, Alekseeva L., Krutkina M., Kozaieva V., Grouzdev D. Unravelling the diversity of magnetotactic bacteria through analysis of open genomic databases // Scientific Data. 2020. V. 7. pii. 252. DOI: 10.1038/s41597-020-00593-0; WOS IF: 8.5; SJR: 2.5; Q1. Количество печатных листов (п.л.) – 2,25; личный вклад – 1,68 п.л.
2. **Uzun M.**, Kozaieva V., Dziuba M., Leão P., Krutkina M., Grouzdev D. Detection of interphylum transfers of the magnetosome gene cluster in magnetotactic bacteria // Frontiers in Microbiology. 2022. V. 13. pii. 945734. DOI:10.3389/fmicb.2022.945734; WOS IF: 6.0; SJR: 1.3; Q1. (2.18/1.36) п.л.
3. **Uzun M.**, Kozaieva V., Dziuba M., Alekseeva L., Krutkina M., Sukhacheva M., Baslerov R., Grouzdev D. Recovery and genome reconstruction of novel magnetotactic *Elusimicrobiota* from bog soil // The ISME Journal. 2023. V. 17. С. 204-214. DOI: 10.1038/s41396-022-01339-z; WOS IF: 11.2; SJR: 3.3; Q1. (2.07/1.55) п.л.

Публикации в прочих научных изданиях:

1. **Узун М.М.**, Козяева В.В., Груздев Д.С. Изучение магнитотактических бактерий как путь исследования микробной темной материи // Материалы 3-го Российского микробиологического конгресса. Псков. 2021. С. 64.
2. **М. Uzun**, L. Alekseeva, M. Krutkina, V. Kozaieva, D. Grouzdev The reconstruction of magnetotactic bacteria genomes from open databases // Материалы летней школы по биоинформатике. Онлайн. 2020. С. 76.
3. **Узун М.М.**, Алексеева Л.М., Круткина М.С., Козяева В.В., Груздев Д.С. Новые магнитотактические бактерии, обнаруженные в метабеномах открытых баз данных // Материалы 2-го Российского микробиологического конгресса. Саранск. 2019. С. 50.
4. D. Grouzdev, **М. Uzun**, M. Krutkina, L. Alekseeva, V. Kozaieva Increased knowledge of magnetotactic bacteria diversity through the analysis of metagenomic data // Abstract book of FEMS2019. Glasgo, UK. 2019. P. 465.
5. **Узун М.**, Алексеева Л.М., Круткина М.С., Козяева В.В., Груздев Д.С. Расширение знаний о разнообразии магнитотактических бактерий посредством анализа метабеномных данных // VIII Международная Школа молодых учёных по молекулярной генетике «Генетическая организация и молекулярные механизмы функционирования живых систем». Звенигород. 2018. С. 111.
6. **Uzun M.**, Kozaieva V.V., Sukhacheva M.V., Leão P., Grouzdev D.S., Alekseeva L.M., Kolganova T.V., Slobodova N.V., Patutina E.O. Novel approaches of magnetotactic bacteria investigation revealed new taxonomic groups. // Abstract book of 6th international meeting on magnetotactic bacteria. Kanazawa, Japan. 2018. P. 25.