

НОВАЯ НЕКУЛЬТИВИРУЕМАЯ БАКТЕРИЯ СЕМЕЙСТВА *GALLIONELLACEAE*, – ОПИСАНИЕ И РЕКОНСТРУКЦИЯ ГЕНОМА НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА МЕТАГЕНОМА МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА КИСЛЫХ ШАХТНЫХ ВОД

© 2016 г. В. В. Кадников^а, Д. А. Ивасенко^б, А. В. Белецкий^а, А. В. Марданов^а,
Э. В. Данилова^с, Н. В. Пименов^д, О. В. Карначук^б, Н. В. Равин^а, *

^аИнститут биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

^бТомский государственный университет

^сИнститут общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ

^дИнститут микробиологии им. С. Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

*e-mail: nravin@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 30.12.2015 г.

Дренажные воды в местах добычи металлов часто характеризуются низким рН и высоким содержанием растворенных металлов вследствие окисления сульфидных минералов. Экстремальные условия таких экосистем ограничивают разнообразие обитающих в них микроорганизмов. Мы исследовали микробное сообщество дренажных вод (температура 6.5°C, рН 2.65) в открытом карьере добычи полиметаллических руд на месторождении Шерловая гора в Забайкалье методами метагеномики. В результате секвенирования метагенома микробное сообщество охарактеризовано на таксономическом и функциональном уровне. Абсолютное большинство микроорганизмов представлено одной некультивируемой линией, представляющей новый вид бета-протеобактерий рода *Gallionella*. Среди культивируемых представителей семейства *Gallionellaceae* нет ацидофилов, но сходные последовательности генов 16S рРНК были детектированы в кислых шахтных дренажах. Минорными компонентами сообщества являются бактерии родов *Thiobacillus*, *Acidobacterium*, *Acidisphaera* и *Acidithiobacillus*, характерные для кислых шахтных дренажей. На основе метагеномных данных определен имеющий размер 3.4 млн нт почти полный композитный геном бактерии этой новой линии, описанной нами как *Candidatus Gallionella acididurans* ShG14-8. Анализ генома показал, что окисление Fe(II), вероятно, осуществляется с участием цитохромов, локализованных на внешней мембране клеток. Электрон-транспортная цепь включает NADH-дегидрогеназу, цитохром *bc1* комплекс, альтернативный комплекс III, и цитохром-оксидазы *bd*, *ccb3*, и *bo3* типа. Окисление восстановленных соединений серы может осуществляться с участием Sox системы, сульфид-хинон оксидоредуктазы, аденилсульфат редуктазы и сульфат аденилтрансферазы. Имеются гены, необходимые для автотрофной фиксации углерода в цикле Кальвина, но пути фиксации азота отсутствует. Устойчивость к тяжелым металлам может обеспечиваться за счет наличия большого числа транспортеров металлов RND семейства и АТФаз Р-типа. Новый микроорганизм является аэробным хемолитоавтотрофом, представляющим группу психротолерантных железо- и серо-окисляющих ацидофилов семейства *Gallionellaceae*, распространенных в кислых шахтных дренажах.

Ключевые слова: кислые шахтные воды, метагеном, окисление железа, *Gallionella*

DOI: 10.7868/S0026365616040108

Кислые шахтные дренажные воды являются объектом пристального внимания микробиологов. Само понятие “кислые шахтные дренажные воды” (acid mine drainage) не имеет четких физических границ и связано с системами, ассоциированными с добычей сульфидных минералов. Попадание сульфидов металлов в места с неограниченным доступом кислорода приводит к развитию процессов их интенсивного окисления (Johnson, Hallberg, 2003), следствием чего является образование большого количества протонов. В

свою очередь, низкий рН среды приводит к переходу металлов из нерастворимых минералов в раствор. Кислые воды с высокой концентрацией металлов и сульфатов характерны для мест складирования различных типов отходов добычи металлов, затопленных шахт и даже целых рек. Они характеризуются низкими значениями рН (1–4), представляя собой экосистемы с экстремальными условиями жизни. Кислые шахтные дренажи, как правило, являются экосистемами с умеренными или низкими температурами, хотя извест-

ны и объекты с более высокими температурами, например шахты Richmond Mine в Калифорнии, в которых температура дренажных вод может достигать 40–60°C.

На протяжении последних двух десятилетий микробные сообщества кислых шахтных дренажей активно исследовали как методами классической микробиологии, так и молекулярными методами, основанными на детекции генов 16S рибосомной РНК (Baker, Banfield, 2003; Méndez-García et al., 2015). В последующем с использованием метагеномного анализа непосредственно природных образцов были определены полные или почти полные геномы ряда микроорганизмов, доминирующих в микробных сообществах кислых шахтных дренажей, охарактеризованы пути фиксации углерода и азота, энергетический метаболизм, роль микроорганизмов в растворении металлов и образовании повышенной кислотности (напр., Tyson et al., 2004; Baker et al., 2010; Chen et al., 2015; Méndez-García et al., 2015;).

Экстремальные физико-химические условия обуславливают сравнительно низкое биоразнообразие микробных сообществ кислых шахтных дренажей. Эти сообщества включают в основном бактерии и археи, хотя в ряде работ отмечается и присутствие эукариотических микроорганизмов (обзор Méndez-García et al., 2015). Бактерии, обитающие в кислых шахтных дренажах, в основном являются представителями филумов *Proteobacteria*, *Nitrospirae*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* и *Firmicutes*. Наиболее характерными обитателями кислых шахтных дренажей являются гамма-протеобактерии рода *Acidithiobacillus*, которые часто доминируют в этих экосистемах. *Acidithiobacillus* являются ацидофилами (оптимальный pH 2–3), а в отношении оптимальной температуры роста – мезофилами. Эти бактерии характеризуются хемолитоавтотрофным метаболизмом и способны в аэробных условиях окислять Fe(II) и восстановленные соединения серы (*A. ferrooxidans*, *A. ferridurans* и *A. ferrivorans*) или только соединения серы (*A. caldus* и др.). Представители *Acidithiobacillus* могут фиксировать CO₂ через цикл Кальвина-Бенсона и N₂ с помощью нитрогеназы (Valdes et al., 2008).

Бета-протеобактерии в основном обнаруживают в условиях не самых экстремальных pH (выше 2). Так, железокисляющая бета-протеобактерия “*Ferrovum muxofaciens*” доминирует в биопленках в дренажных водах шахт Сae Coch Северного Уэльса с pH 2–3 и температурой 10–15°C (Kimura et al., 2011). Анализ неполного генома этой бактерии показал, что она обладает возможностями как автотрофного (фиксация CO₂ и N₂), так и гетеротрофного метаболизма (Moуа-Beltran et al., 2014). В дренажных водах шахт, используемых для добычи свинца и цинка в районе Carnoules (Франция), были обнаружены бета-протеобакте-

рии, близкие к нейтрофильной железокисляющей бактерии *Gallionella ferruginea* (Bruneel et al., 2006). Близкие к *Gallionella* железокисляющие бактерии были также обнаружены в урановых шахтах (Ronneburg, Германия) (Fabisch et al., 2013). Среди других бета-протеобактерий были обнаружены гетеротрофы родов *Thiomonas*, *Ralstonia* и *Acidovorax*. Так, представители *Thiomonas* являются факультативными гетеротрофами, оптимально растущими в среде, содержащей восстановленные неорганические соединения серы и органические добавки (Arsène-Ploetze et al., 2010). Среди альфа-протеобактерий в кислых шахтных дренажах встречаются гетеротрофы семейства *Acetobacteraceae*, относящиеся к родам *Acidiphilum*, *Acidocella* и *Acidisphaera* (Méndez-García et al., 2015).

Представители рода *Leptospirillum*, относящегося к филуму *Nitrospirae*, часто встречаются в кислых шахтных дренажах и доминируют в сообществах, развивающихся в условиях наиболее экстремальных pH (1 и ниже) и повышенной температуры (25–40°C), например, в шахтах Richmond Mine в Калифорнии (Tyson et al., 2004). Эти бактерии являются облигатными хемолитоавтотрофами, получающими энергию за счет окисления железа. Осуществляя фиксацию CO₂ и N₂, они являются первичными продуцентами в этих экосистемах. Представители филумов *Actinobacteria* и *Acidobacteria*, встречающиеся в кислых шахтных дренажах, являются гетеротрофами. Это железокисляющие актинобактерии родов *Ferrimicrobium* и *Acidimicrobium* (Bacelar-Nicolau, Johnson, 1999) и представители рода *Acidobacterium*. Среди бактерий филума *Firmicutes* наиболее часто в шахтных дренажах встречаются клостридии рода *Sulfobacillus* (Travisany et al., 2012).

Разнообразие архей, встречающихся в кислых шахтных дренажах, существенно меньше и ограничивается умеренными термофилами порядка *Thermoplasmatales*. Чаще всего встречаются представители рода *Ferroplasma* (Golyshina et al., 2000), являющиеся железокисляющими термоацидофилами (pH 1–2; ~40°C). В частности, эти археи были обнаружены при метагеномных исследованиях биопленок в Richmond Mine (Tyson et al., 2004).

Разнообразие и роль эукариот в кислых шахтных дренажах мало изучены. В открытых системах, таких как Rio Tinto (Испания), были обнаружены различные красные и зеленые водоросли и простейшие. Эукариоты присутствуют и в подземных шахтных дренажах, например, в биопленках Richmond Mine были обнаружены различные грибы (Méndez-García et al., 2015).

Несмотря на большой интерес к кислым шахтным дренажам, метагеномные и другие “омиксные” методы до настоящего времени применялись для

исследования сравнительно небольшого числа объектов. Это, прежде всего, Richmond Mine в Калифорнии, свинцово-цинковые шахты Car-poulès во Франции, месторождения пиритов Drei Kronen und Ehart в Германии, месторождение ртуты Los Rueldos в Испании и несколько шахт в Китае (Méndez-García et al., 2015). Гораздо больше объектов было охарактеризовано на уровне состава микробных сообществ, т.е. пиросеквенирования генов 16S рРНК. Однако такие исследования не проводились для кислых дренажей из рудных месторождений в России, для многих из которых характерны не только низкий рН и высокая концентрация металлов, но и постоянно низкая температура, обуславливающая развитие психрофильных микробных сообществ.

Задачами исследования были: провести метагеномный анализ кислых дренажных вод в месторождении Шерловая гора в Читинской области; по результатам секвенирования метагенома установить состав этого микробного сообщества и определить последовательность генома доминирующего в сообществе микроорганизма, бета-протеобактерии семейства *Gallionellaceae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб и характеристика химического состава воды. Пробы воды из скважины ShG14-8 были отобраны дважды: 27.07.2014 г. и 30.07.2014 г. Отбор проб для измерения физико-химических характеристик и выделения ДНК проводили с использованием стерильной пластиковой бутылки. Eh, рН и температуру измеряли в обеих пробах, для выделения ДНК использовали пробу, отобранную 30.07.2014 г. В этой же пробе анализировали ионы и проводили элементный анализ.

Температуру, рН и окислительно-восстановительный потенциал определяли на месте рН-метром HANNA HI 8314F. Воду для анализа содержания ионов (30 мл) и элементного анализа (15 мл) фильтровали на месте через фильтр 0.45 мкм. Элементный анализ воды проводили в Геологической Службе Великобритании и ООО “Химико-аналитический центр “Плазма” (г. Томск) методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS), анализ ионов – на ионном хроматографе.

Выделение и секвенирование метагеномной ДНК. Для сбора биомассы микроорганизмов образец дренажных вод (около 15 л) пропускали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Для растворения частиц железа фильтры промывали 0.3 М раствором оксалата аммония (рН 3.0) как описано в работе (Senko et al., 2008). Фильтры гомогенизировали, растирая с жидким азотом, препарат метагеномной ДНК выделяли методом, основанном на лизисе клеток с последующей обработкой

детергентом СТАВ (Wilson, 1987). Всего было выделено около 1 мкг ДНК.

Для проведения секвенирования создавали библиотеку случайных фрагментов (shotgun library) метагеномной ДНК с размером фрагментов 700–1000 нт. Пиросеквенирование библиотеки осуществляли на геномном анализаторе GS FLX (“Roche”, Швейцария) по протоколу Titanium с использованием набора реактивов GS FLX Titanium Sequencing Kit XL+. Создание библиотеки, амплификацию и секвенирование на GS FLX проводили следуя соответствующим протоколам фирмы “Roche”. Сборку полученных чтений в контиги проводили с помощью программы GS De Novo Assembler v. 2.6 (Roche).

Аннотация и анализ метагеномных данных. Поиск генов и их аннотацию проводили в контигах длиной более 500 нт. Для поиска генов и их аннотации использовали программу MetaGeneMark (Zhu et al., 2010) и онлайн сервис для анализа метагеномных данных MG-RAST (Meyer et al., 2008). Идентификацию трансмембранных доменов в аминокислотных последовательностях предсказанных белков проводили с помощью онлайн сервиса ТНММ 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TNMM/>), N-концевые сигнальные пептиды идентифицировали с помощью SignalP v. 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

Для разбиения метагеномных контигов на кластеры, соответствующие отдельным микроорганизмам – членам сообщества, использовали программу CONCOCT (Aineberg et al., 2014) и алгоритм кластеризации, использующий частоты встречаемости тетрануклеотидов и самоорганизующиеся карты Кохонена, реализованный с помощью Databionic ESOM Tools и perl скриптов (Dick et al., 2009).

Для характеристики состава сообщества по отдельным чтениям (т.е. без сборки контигов) все последовательности чтений сравнивали с базой 16S РНК Greengenes с помощью BLASTN. Из отобранных по гомологии 608 чтений удаляли участки (могут быть на одном из концов), не имеющие гомологии с 16S РНК. Таксономическую классификацию отобранных последовательностей проводили с помощью программы RDP Classifier (Cole et al., 2009).

Филогенетический анализ. Последовательности генов 16S рРНК выравнивали с помощью программы MUSCLE, включенной в пакет MEGA 6.0 (Tamura et al., 2011). Предварительно из алаймента удаляли неоднозначно выравнивающиеся участки с помощью Gblocks (Talavera, Castresana, 2007). Филогенетические деревья строили методом maximum likelihood с помощью MEGA 6.0. Достоверность ветвлений оценивали с помощью бутстрепа.

Таблица 1. Изменение некоторых физико-химических характеристик воды в скважине ShG14-8 в зависимости от времени отбора проб

Характеристика, единицы измерения	27.07.2014	30.07.2014
Температура, °C	6.3	6.5
pH	3.66	2.65
Eh, mV	+475	+447

Для филогенетического анализа на основе рибосомных белков использовали 54 белка: S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17, S18, S19, S20, S21, L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7/L12, L9, L10, L11, L13, L14, L15, L16, L17, L18, L19, L20, L21, L22, L23, L24, L25, L27, L28, L29, L30, L31, L32, L33, L34, L35 и L36. Конкатенированные последовательности выравнивали с помощью MUSCLE, удаляли неоднозначно выравненные участки с помощью Gblocks и строили филогенетическое дерево методом maximum likelihood с помощью MEGA 6.0.

Величину ДНК-ДНК гибридизации *in silico* определяли с помощью программы GGDC 2 (Meier-Kolthoff et al., 2013), доступной на сайте <http://ggdc.dsmz.de/>.

Нуклеотидные последовательности. Нуклеотидные последовательности генома *Candidatus Gallionella acididurans* ShG14-8 и гена 16S рРНК этой бактерии депонированы в GenBank под номерами LSLI00000000 и KU587047 соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Место отбора проб и физико-химические характеристики дренажных вод. Месторождение Шерловая Гора находится в 250 км к юго-востоку от Читы и располагается в зоне Восточно-Агинского глубинного разлома (Абрамов, 2011). Основными рудами, добываемыми с начала XX века, были вольфрамовая, висмутовая и, позднее, оловянная. Основной оловянной рудой является касситерит, другие рудные минералы – арсенопирит, халькопирит, сфалерит, пирит. Реже встречаются марказит, пирротин, галенит, ильменит (Кулагашев, 1968). В 1962 г. была введена в эксплуатацию обогатительная фабрика и началась добыча коренных руд карьерным способом. С 1992 г. разработка карьера прекращена, в настоящее время он частично затоплен. На восточной террасе карьера находится ряд скважин глубиной 7–17 м, которые могут являться разведочными шурфами или скважинами для закладки взрывчатых материалов.

Скважина ShG14-8 представляла собой открытую вертикально пробуренную колонку глубиной около 17 м и диаметром 0.2 м, заполненную водой, начиная с глубины 6 м. Форма расположения

устья шурфа на поверхности не предполагала его непосредственное наполнение потоками дождевых вод с поверхности.

Вода в скважине характеризовалась низким рН и высоким окислительно-восстановительным потенциалом (табл. 1). Физико-химические параметры воды были измерены дважды с разницей в трое суток (табл. 1). Между первым и вторым отбором проб прошли дожди. Первоначально вода была бесцветной, однако при опробовании скважины второй раз, она стала светло-желтой. Изменение цвета и снижение рН после интенсивных осадков свидетельствует о том, что источником воды в скважине скорее являются инфильтрующиеся через окружающие горные породы дождевые воды, нежели подземные водоносные горизонты. Вода была существенно окислена, о чем свидетельствовал окислительно-восстановительный потенциал.

Химический анализ проводили для пробы воды, отобранной 30.07.2014 г. Высокое содержание в воде железа (434 мг/л) и сульфатов (3.63 г/л) свидетельствует об активном протекании процессов окисления остаточных сульфидов (табл. 2). Из растворенных металлов в высоких концентрациях были обнаружены цинк (596 мг/л) и кадмий (38.8 мг/л), что согласуется с присутствием сфалерита (ZnS, содержащий примеси Cd) в руде. Концентрация кобальта, никеля и свинца не превышала 10 мг/л. Несмотря на указания в литературе о высоком содержании арсенопирита, концентрация мышьяка была относительно невысокой (3.92 мг/л) по сравнению с содержанием цинка и кадмия. Высокая концентрация алюминия (170 мг/л) в воде свидетельствует о протекании гидролиза алюмосиликатов при низком рН. Высокая кислотность, по-видимому, обусловлена окислением остаточных сульфидов, что соответствует высокому содержанию сульфатов (3631 мг/л). Содержание ионов хлора, нитрата, нитрита и фосфата незначительное.

Метагеном микробного сообщества дренажных вод ShG 14-8: состав сообщества. В метагеномных исследованиях использовали пробу воды с рН 2.65, отобранную 30.07.2014 г. С учетом ограниченного количества ДНК (~1 мкг) для характеристики метагенома мы получили библиотеку случайных фрагментов и провели ее пиросеквенирование на геномном анализаторе GS FLX (Roche). Всего было получено 737 тыс. чтений средней длиной 526 нт, т.е. общий объем прочтенных последовательностей составил около 387 млн нт. В результате сборки нуклеотидных последовательностей было получено 3983 контига длиной более 500 нт, суммарная длина которых составила 8.7 млн нт. Длина N50 контига (т.е. 50% всей последовательности представлено в контигах длины N50 и более) составила 2678 нт, самый длинный контиг имел длину 101236 нт. Та-

кое соотношение указывает на наличие в метагеноме небольшого числа доминирующих организмов, геномы которых прочтены с высокой кратностью и хорошо собираются в длинные контиги, наряду с организмами, доли которых в сообществе невелики.

В собранных метагеномных контигах было идентифицировано 8104 потенциальных белок-кодирующих гена, из которых 1731 не имеют гомологов в базе данных NCBI (RefSeq и GenBank). В результате аннотации для 5503 белков с различной степенью достоверности и детализации были предсказаны вероятные функции.

Для характеристики разнообразия и видового состава сообщества мы идентифицировали последовательности генов рРНК в метагеномных контигах. Было обнаружено 8 контигов, содержащие гены 16/18S рРНК или их фрагменты (табл. 3). Таксономическую принадлежность найденных последовательностей 16/18S рРНК проводили в результате их сравнения с базой данных NCBI. Характеристикой доли соответствующего микроорганизма в сообществе является “кратность” прочтения последовательности гена 16/18S рРНК в контиге, которую определяли, “накладывая” на них полученные при секвенировании метагенома отдельные чтения. 7 из 8 найденных последовательностей имели идентичность на уровне выше 95% с генами 16/18S рРНК культивируемых микроорганизмов, что позволило идентифицировать их на уровне рода. Наиболее высокую кратность прочтения (174.7) имел контиг 00171, содержащий полноразмерный ген 16S рРНК, на 95% идентичный 16S рРНК бета-протеобактерии *Gallionella capsiferriformans* ES-2. Кратность прочтения остальных контигов находилась в интервале от 3 до 8, т.е. все они представляли минорные компоненты сообщества. Это бета-протеобактерии рода *Thiobacillus*, альфа-протеобактерии рода *Acidisphaera*, гамма-протеобактерии рода *Acidithiobacillus* (два контига, соответствующие началу и концу гена 16S рРНК), ацидобактерии рода *Acidobacterium*. Контиг 00115 длиной 5943 нт содержал фрагмент гена рРНК, имеющий 100% идентичность с 18S рРНК различных грибов родов *Articulospora*, *Fontanospora*, *Acremonium* и *Phialophora*, однако наибольшую гомологию за пределами этого участка он имел с кластером генов рибосомной РНК гриба *Articulospora tetracladia*. Последовательность 16S РНК в контиге 00176 имела лишь 83% идентичности с ближайшим культивируемым представителем и, вероятно, представляла новую линию дельта-протеобактерий.

Таким образом, исходя из кратности прочтения последовательностей 16S РНК, можно сделать вывод о том, что доминирующим микроорганизмом в прокариотической части сообщества является бактерия рода *Gallionella*, доля которой

Таблица 2. Концентрация некоторых анионов (ионная хроматография) и элементов (ICP-MS) в исследованном образце кислых дренажных вод ShG14-8

Анион/элемент	Содержание, мг/л
Анионы	
Cl ⁻	<12.5
SO ₄ ²⁻	3.631
NO ₃ ⁻	<7.5
Br ⁻	<2.5
HPO ₄ ²⁻	<2.5
F ⁻	4.6
Катионы и металлы	
Ca	81
Na	1.4
Mg	151
Al	170
Fe	434
Mn	48.7
Cu	6.67
Zn	787
As	3.92
Cd	34.6
Co	1.2
Ni	2.0
Pb	0.44
Cr	0.20
U	1.29
Y	3.85
S, Se, Si и P	
Si	14
P	2.4
S	1233
Se	0.10

составляет около 86%, а доли остальных 5 линий бактерий не превышают 4% каждая.

Приведенный выше анализ может занижать разнообразие и доли минорных членов сообщества, поскольку их последовательности 16S рРНК могут не собраться в контиги из-за низкого покрытия. Поэтому для их идентификации мы проанализировали непосредственно чтения, определенные в реакциях пиросеквенирования. Было идентифицировано 608 чтений, имевших гомологию с 16S рРНК прокариот, и проведена их таксономическая классификация с помощью RDP Classifier. Поскольку чтения могут “попадать” как в переменные, так и в консервативные участки

Таблица 3. Таксономическая идентификация последовательностей генов 16S рРНК, найденных в метагеномных контигах

№ контига	Длина фрагмента гена 16/18S рРНК (нт)	Кратность прочтения фрагмента гена 16/18S рРНК	Доля в сообществе (%)	Ближайший гомолог (из культивируемых микроорганизмов)	GenBank ID	Идентичность (%)
<i>Alpha-proteobacteria</i>						
00230	1482	7.9	3.9	<i>Acidisphaera</i> sp. NO-15	AF376024	99
<i>Beta-proteobacteria</i>						
00171	1528	174.7	85.7	<i>Gallionella capsiferriformans</i> ES-2	NR_074658	95
00697	961	6.0	2.9	<i>Thiobacillus</i> sp. ML2-16	DQ145970	97
<i>Gamma-proteobacteria</i>						
01481*	1083	5.2	2.6	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> SS3	NR_074660	99
03646*	407	6.3		<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> SS3	NR_074660	99
<i>Delta-proteobacteria</i>						
00176	1521	6.8	3.3	<i>Desulfomonile tiedjei</i> DSM 6799	CP003360	83
<i>Acidobacteria</i>						
01950	1210	3.3	1.6	<i>Acidobacterium</i> sp. pan6	KJ207213	96
<i>Eukarya (fungi)</i>						
00115	535	6.5	—	<i>Articulospora tetracladia</i> CCM F-11113 **	KP234359	100

* Контиги 01481 и 03646 представляют 5'- и 3'-концевые области гена 16S рРНК соответственно, т.е. его полная последовательность разбита на два контига.

** 100% идентичность с генами 18S рРНК различных грибов родов *Articulospora*, *Fontanospora*, *Acremonium* и *Phialophora*.

16S рРНК, точность такой классификации ниже и надежная идентификация возможна лишь на более высоком таксономическом уровне. Тем не менее, результаты этого анализа в основном согласуются с представленными выше данными: абсолютное большинство чтений относилось к бета-протеобактериям (81%, в т.ч. 76% представляли *Gallionella*), минорными компонентами были протеобактерии классов альфа (6.9%) и гамма (4.3%), а также представители филумов *Acidobacteria* (1.3%), *Actinobacteria* (1.6%) и *Firmicutes* (1.2%). Около 2.8% чтений не были классифицированы и, вероятно, представляли обнаруженную нами линию дельта-протеобактерий, для которой отсутствуют филогенетически близкие культивируемые организмы.

Сборка композитного генома *Gallionella* ShG14-8 и анализ филогенетического положения новой бактерии. Для определения последовательностей генома доминирующей в сообществе бактерии рода *Gallionella* мы провели кластеризацию метагеномных контигов, имеющую целью их отнесение к различным организмам. Поскольку по 16S рРНК *Gallionella* составляет более 85% сообщества, кратность прочтения относящихся к ней контигов будет существенно более высокой (50–100 раз), чем остальных контигов (менее 10), что облегчает кластеризацию. Для кластеризации использовали два метода. Во-первых, алгоритмом кластеризации, использующим частоты встречаемости тет-

рануклеотидов и самоорганизующиеся карты Кохонена, реализованным с помощью Databionic ESOM Tools и perl скриптов (Dick et al., 2009), проводили разбиение на кластеры контигов длиной более 2000 нт. Дополнительно разбиение на кластеры проводили с помощью программы CONCOCT (Alneberg et al., 2014), которая кластеризует контиги на основе частот встречаемости сочетаний нуклеотидов и кратности прочтения. 94% всех контигов с высоким покрытием длиной от 2000 нуклеотидов были отнесены CONCOCT к одному кластеру, соответствующему *Gallionella*. Оставшиеся 6% контигов были вручную проинспектированы по карте Кохонена, построенной в ESOM. Было обнаружено, что эти контиги тоже попадают в кластер *Gallionella*. Данные ESOM так же подтверждают правильность результатов кластеризации, полученных с помощью CONCOCT. Короткие контиги длиной менее 2000 нт, которые часто представляют повторы, невозможно точно классифицировать по частотам встречаемости сочетаний нуклеотидов, так как на коротких промежутках и для мобильных элементов эти частоты могут отличаться от характерных для генома в целом. Такие контиги были отнесены к *Gallionella* только на основании покрытия (35-кратное и выше), длина таких контигов составляет 4% от суммарной длины контигов *Gallionella*.

Таким образом, мы определили композитный геном новой бактерии рода *Gallionella*, представ-

ленный 316 контигами общей длиной 3434294 нт. Медианная длина контига составляла 26456 нт, средняя кратность прочтения – 84. Из 387 млн нт метагеномных последовательностей к *Gallionella* ShG14-8 относились 288 млн нт, что соответствует 74%-ной доле ее генома во всем метагеноме.

Анализ наличия в геноме *Gallionella* ShG14-8 набора консервативных маркерных генов, присутствующих в единичных копиях в геномах бактерий (McLean et al., 2013), выявил наличие всех 108 таких генов, т.е. композитный геном является практически полным. Филогенетический анализ на основе последовательностей генов 16S рРНК показал, что новая бактерия *Gallionella* ShG14-8 относится к семейству *Gallionellaceae* и, вместе с различными последовательностями 16S рРНК некультивируемых бактерий, образует кластер, близкий к культивируемым видам рода *Gallionella*, однако с низким уровнем поддержки (рис. 1а). Для уточнения положения новой линии мы провели филогенетический анализ на основе конкатенированных последовательностей рибосомных белков. Полученные результаты (рис. 1б) соответствуют филогении по 16S рРНК и показывают кластеризацию новой бактерии с *Gallionella capsiferriformans*. С учетом 95% сходства последовательностей 16S рРНК новой бактерии и ближайшего культивируемого изолята, *G. capsiferriformans* ES-2, результаты филогенетического анализа указывают на то, что *Gallionella* ShG14-8 и близкие “некультивируемые” бактерии образуют новый вид рода *Gallionella*, который мы предлагаем назвать *Candidatus Gallionella acididurans* ShG14-8. Определенный *in silico* уровень ДНК-ДНК гибридизации новой бактерии и *G. capsiferriformans* ES-2 составляет лишь около 20%, что подтверждает различия между ними как минимум на уровне вида.

Поиск последовательностей генов 16S рРНК в GenBank, близких к 16S рРНК линии ShG14-8, выявил большое число клонов (47 последовательностей с идентичностью выше 97% и 256 с идентичностью выше 95%, по данным на 30.12.2015 г.) которые были идентифицированы при молекулярных исследованиях кислых шахтных дренажей, железосодержащих пресных вод, озерных осадков и других подобных экологических ниш в различных странах. Однако эти некультивируемые микроорганизмы не были охарактеризованы на геномном уровне.

Характеристика путей метаболизма *Ca. Gallionella acididurans* на основе геномных данных. Ближайшие родственники *Ca. Gallionella acididurans*, для которых определены геномные последовательности, *G. capsiferriformans* ES-2 и *Sideroxydans lithotrophicus* ES-1 (Emerson et al., 2013), являются хемолитоавтотрофными аэробами, получающими энергию за счет окисления Fe(II). Сравнение предсказанных белков, кодируемых геномами

этих бактерий, показало, что из 3521 белок-кодирующих генов *Ca. Gallionella acididurans* 1767 имеют гомологов у *G. capsiferriformans* ES-2, и 1980 – у *S. lithotrophicus* ES-1, при этом 1392 гена имеются у всех трех бактерий.

Для того, чтобы использовать окисление Fe(II) до Fe(III) в качестве источника энергии, железокисляющие микроорганизмы должны передавать электроны, образующиеся при окислении Fe(II) в электрон-транспортную цепь, обеспечивающую образование трансмембранного градиента протонов, используемого для синтеза АТФ. Поскольку Fe(II) присутствует в среде в нерастворимой форме, первичный сайт окисления железа должен находиться на внешней мембране клетки, и должен существовать механизм передачи электронов через периплазму на цитоплазматическую мембрану. *G. capsiferriformans* ES-1 и *S. lithotrophicus* ES-2 содержат гомологи генов, кодирующих цитохромы MtrA/B бактерии *Shewanella oneidensis* MR-1, участвующие в восстановлении железа на поверхности клетки (Liu et al., 2012). В геномах *G. capsiferriformans* ES-2 и *S. lithotrophicus* ES-1 эти гены входят в состав кластеров, кодирующих другие цитохромы, которые в целом обеспечивают функционирование пути окисления железа. Однако в геноме *Ca. Gallionella acididurans* этот кластер отсутствует.

Пути аэробного окисления железа хорошо изучены у ацидофильной бактерии *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. Окисление железа у нее катализирует цитохром Cys2, локализованный на внешней мембране (Bonnefof, Holmes, 2012). В геноме *Ca. Gallionella acididurans* имеется кластер из двух генов, AWT59_1786 и 1787 (здесь и далее нумерация генов приведена в соответствии с аннотацией генома *Ca. Gallionella acididurans*, представленной в GenBank LSLI00000000), кодирующих Cys2-подобные цитохромы. Оба белка содержат N-концевые сигнальные последовательности, которые могут обеспечивать их экспорт из цитоплазмы и гем-связывающие мотивы CXXCH в N-концевой части молекулы. Гомологичные цитохромы имеются и в геномах других микроаэрофильных железокисляющих бактерий, включая *G. capsiferriformans* ES-2 и *S. lithotrophicus* ES-1 (Emerson et al., 2013), *Ferriphaseselus amnicola* OYT1 (Kato et al., 2015) и метагеномах бактериальных матов, образованных железокисляющими бактериями (Varco et al., 2015). Электроны, образовавшиеся в результате окисления Fe(II) на внешней мембране, у *A. ferrooxidans* переносятся на цитоплазматическую мембрану периплазматическим цитохромом Cys1 (Bonnefof, Holmes, 2012). Хотя мы не обнаружили у *Ca. Gallionella acididurans* явного гомолога этого белка, всего в ее геноме имеется не менее 15 цитохромов *c*, некоторые из которых могут выполнять эту функцию.

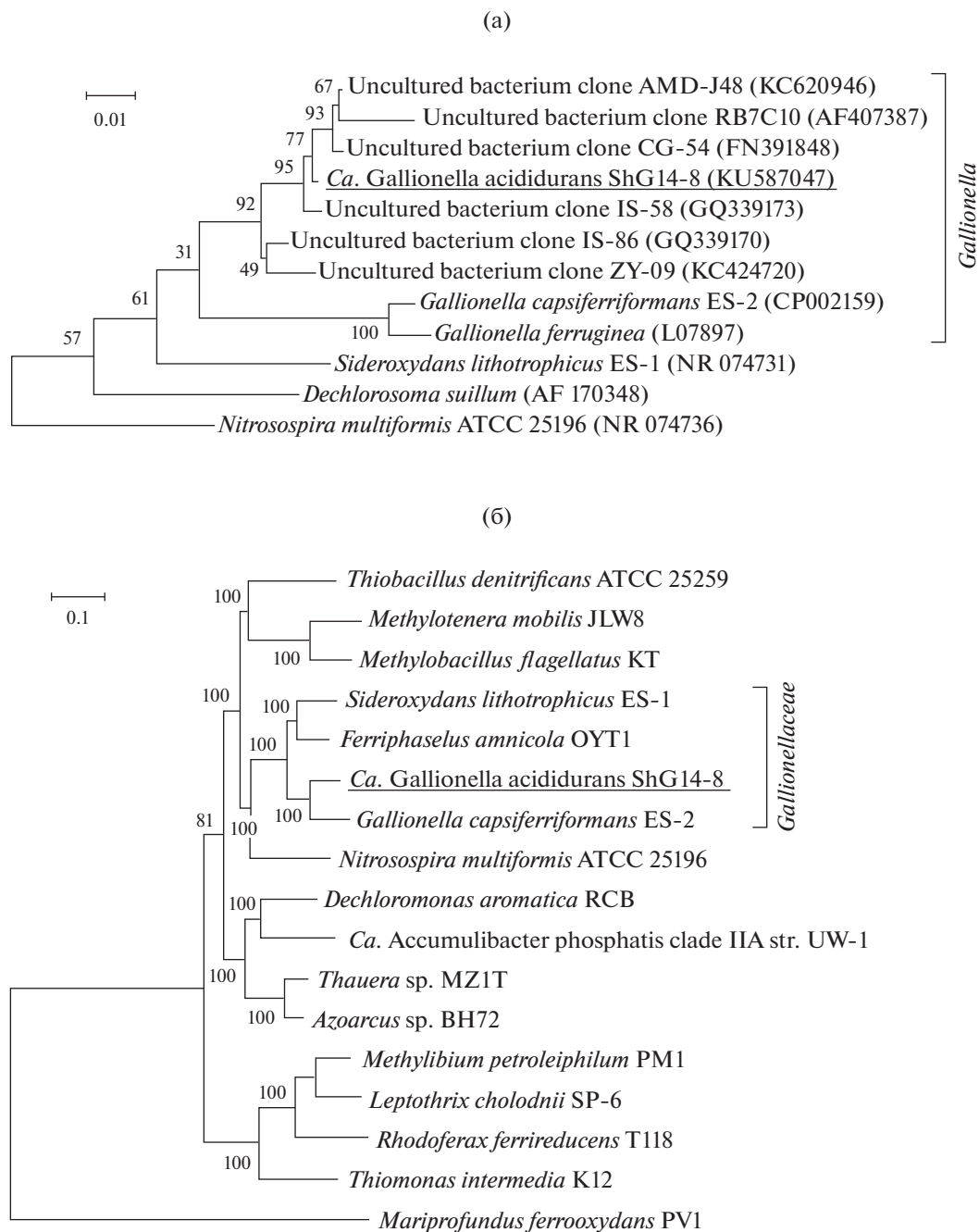


Рис. 1. Филогенетическое положение *Candidatus Gallionella acididurans* ShG14-8. Филогенетические деревья были построены методом Maximum likelihood по нуклеотидным последовательностям генов 16S рРНК (а) или по конкатенированным аминокислотным последовательностям рибосомных белков (б). Цифры у ветвей указывают бутстреп-поддержку (100 реплик). Номера последовательностей в GenBank на панели (а) указаны в скобках после названий организмов или клонов.

Поток поступивших на цитоплазматическую мембрану электронов у железоокисляющих бактерий разветвляется: часть из них переносится к терминальным цитохром оксидазам, а другая часть — к цитохром *bc*₁ комплексу (Комплекс III), который восстанавливает хиноны, которые, в свою очередь

восстанавливают НАД⁺ до НАДН в результате работы НАДН дегидрогеназы (Комплекс I). Геном *Ca. Gallionella acididurans* содержит полный набор генов НАДН дегидрогеназы, цитохром *bc*₁ комплекс (AWT59_1052-1054), и альтернативный комплекс III, который может функционировать в

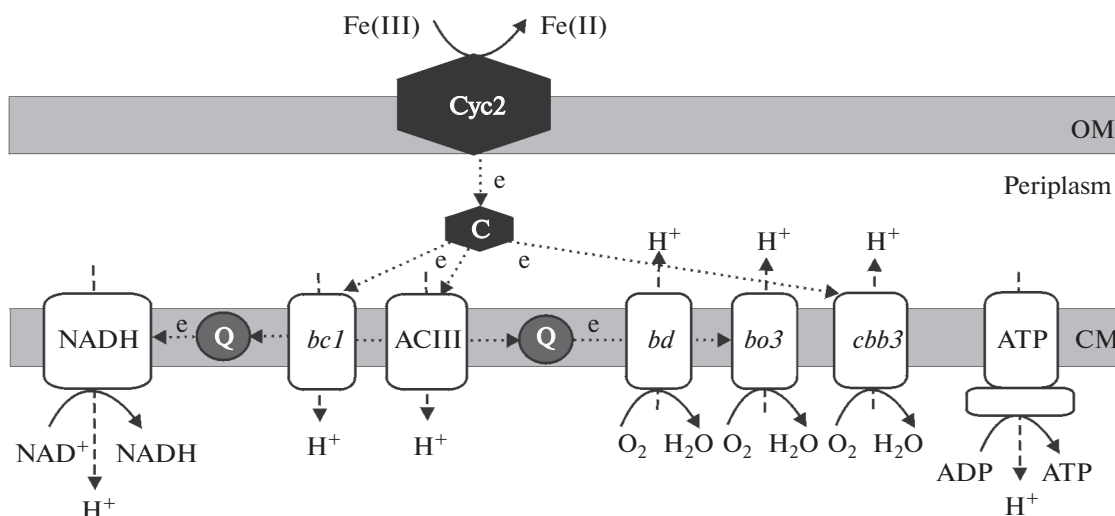


Рис. 2. Схема электрон-транспортной цепи *G. acididurans* ShG14-8, связанной с окислением Fe(II), синтезом NADH и АТФ. Обозначения: ОМ — внешняя клеточная мембрана; СМ — цитоплазматическая мембрана; periplasm, периплазматическое пространство; Cys2 — экспонированный на внешней мембране цитохром, выполняющий функции оксидазы Fe(II); C — периплазматические цитохромы c, выполняющие функцию переносчика электронов; Q — пул хинонов; NADH, NADH дегидрогеназа (комплекс I); bc1 — цитохром bc₁ комплекс; ACIII — альтернативный комплекс III; bd — цитохром bd оксидаза; bo₃ — цитохром bo₃ оксидаза; cbb3 — цитохром c оксидаза cbb₃ типа; АТФ — АТФ синтаза F₁F₀ типа.

качестве хинон-редуктазы или оксидазы (Refojo et al., 2012). Этот комплекс кодируется кластером из 7 генов *actAB1B2CDEF* (AWT59_1776-1782), локализованным вблизи генов *cys2* железоокисляющих цитохромов. Аналогичные кластеры генов, расположенных в том же порядке, были идентифицированы в геномах других железоокисляющих протеобактерий, включая *G. capsiferriformans* ES-2 и *S. lithotrophicus* ES-1 (Emerson et al., 2013; Kato et al., 2015).

Электроны, не использованные для обратного транспорта к НАДН дегидрогеназе, поступают к терминальным цитохромоксидазам, создающим трансмембранный протонный градиент, используемый мембранной АТФазой для синтеза АТФ. Геном *Ca. Gallionella acididurans* кодирует несколько таких комплексов. Это цитохромоксидаза *cbb₃* типа (AWT59_1576-1579) и цитохром *bd* хинол оксидаза (AWT59_2471-2472). Обе эти оксидазы имеют высокую аффинность к кислороду (Borisov et al., 2011) и характерны для бактерий, обитающих в микроаэробных условиях. Особенностью *G. acididurans* является наличие у нее цитохром *bo₃* хинол оксидазы, 4 субъединицы которой кодируются опероном AWT59_1858-1855 (*coxII, I, III, IV*). Цитохромоксидазы этого типа, отсутствующие у *G. capsiferriformans* ES-2, *S. lithotrophicus* ES-1 и *Ferriphaseilus* sp., характерны для аэробных бактерий и активны при высоких концентрациях кислорода (Tseng et al., 1996). Конечным компонентом электрон-транспортной цепи является мембранная АТФ синтаза F₁F₀ типа, кодируемая кластером генов AWT59_

0571-0579. Схема электрон-транспортных цепей, связанных с окислением Fe(II), представлена на рис. 2.

Большинство железоокисляющих бактерий, включая *G. capsiferriformans* ES-2, неспособны окислять восстановленные соединения серы. Одним из исключений является *S. lithotrophicus* ES-1, который может окислять тиосульфат, что согласуется с наличием у него генов, обеспечивающих окисление серы (Emerson et al., 2013). Как и *S. lithotrophicus* ES-1, *Ca. Gallionella acididurans* имеет гены *soxXYZAB*, (AWT59_3135-3133 и AWT59_3131-3130), продукты которых участвуют в окислении сульфида и тиосульфата (Ghosh, Dam, 2009). Также имеются гены ферментов диссимиляционной сульфит редуктазы (*dsr*), которые катализируют окисление элементной серы до сульфита у серо-окисляющих бактерий, например, *Allochormatium venosum*, и восстановление сульфита до серы у сульфат-редукторов. Этот кластер из 13 генов, *dsrABEFHCSMKLJOPN* (AWT59_1071-1059), присутствует и в геномах *S. lithotrophicus* ES-1 и *Ferriphaseilus* sp. (Emerson et al., 2013; Kato et al., 2015). Как и у *S. lithotrophicus* ES-1, в геноме *Ca. Gallionella acididurans* имеются гены, кодирующие сульфат аденилтрансферазу и аденилсульфат редуктазу (AWT59_1842, 1844-1846 и AWT59_0201-0203), которые могут обеспечивать окисление сульфита до сульфата. Также мы обнаружили ген AWT59_2157, кодирующий предполагаемую сульфид:хинон оксидоредуктазу (*Sqr*), которая окисляет сульфид до элементной серы. Ге-

ны *soeABC*, кодирующие окисляющий серу фермент у *Ferriphaselus* sp. (Kato et al., 2015), в геноме *Ca. Gallionella acididurans* отсутствуют. Еще один комплекс ферментов кодируется генами AWT59_1707-1703. Он включает три цитохрома *c*, два из которых содержат сигнальные пептиды и, вероятно, экспонированы на внешней стороне мембраны, 4Fe-4S ферредоксин и NrfD-подобный мембранный белок. Такие ферменты могут переносить электроны между хинонами и внешним акцептором/донором электронов. Возможно, что у *Ca. Gallionella acididurans* этот комплекс может участвовать в окислении восстановленных соединений серы или наоборот, функционировать в качестве терминальной редуктазы в анаэробных условиях. Таким образом, кодируемые геномом *Ca. Gallionella acididurans* ферменты позволяют этой бактерии использовать в качестве источника энергии не только Fe(II), но и восстановленные соединения серы.

Большинство аэробных железоокисляющих бактерий, включая представителей семейства *Gallionellaceae*, являются автотрофами (Kato et al., 2009). Анализ генома *Ca. Gallionella acididurans* также указывает на возможность автотрофной фиксации CO₂, поскольку в нем имеются все гены пути Кальвина-Бенсона, включая рибулоз-1,5-бифосфат карбоксилазу (RubisCO). В геноме *Ca. Gallionella acididurans* имеются 4 набора генов RubisCO. Ген AWT59_1637 кодирует RubisCO типа II; ферменты этого типа имеются у всех микроаэрофильных железоокисляющих бактерий (Kato et al., 2015). Три других кластера генов кодируют большую (AWT59_1755, 2052 и 2790) и малую (AWT59_1754, 2051 и 2789) субъединицы RubisCO типа I. Эти ферменты имеются лишь у некоторых железоокисляющих бактерий, например, он отсутствует у *G. capsiferriformans* ES-2, но имеется (в единичной копии) у *S. lithotrophicus* ES-1. Известно, что RubisCO типа II адаптированы к низкой концентрации O₂ и высокой концентрации CO₂ (Badger, Век, 2008), а ферменты типа I активны при высоких концентрациях O₂. Тот факт, что *Ca. Gallionella acididurans* имеет RubisCO обоих типов, причем один из них в трех копиях, указывает на то, что эта бактерия может быть толерантна к флуктуациям концентрации кислорода. В отличие от *S. lithotrophicus* ES-1, *G. capsiferriformans* ES-2 и *Ferriphaselus* sp., в геноме *Ca. Gallionella acididurans* имеются гены структурных белков карбоксином (AWT59_2399 и 2784-2787), в которых может осуществляться фиксация CO₂.

Многие микроаэрофильные железоокисляющие бактерии, в частности, *S. lithotrophicus* ES-1 и *Ferriphaselus* sp., обладают способностью к азотфиксации (Emerson et al., 2013; Kato et al., 2015). Однако в геноме *Ca. Gallionella acididurans*, как и у *G. capsiferriformans* ES-2, ключевые *nif* гены отсут-

ствуют. У *Ca. Gallionella acididurans* имеется три транспортера аммония, один из которых, как и у неспособной к фиксации N₂ бактерии *Leptospirillum ferriphilum*, входят в один оперон с геном азотрегулирующего белка PII. Обеспечение азотом может также осуществляться за счет активности нитрат-редуктазы (AWT59_1628), относящейся к семейству молибдоптериновых оксидоредуктаз, и нитритредуктазы, большая и малая субъединицы которой кодируются генами AWT59_1630 и AWT59_1629 в том же кластере. Еще одна нитритредуктаза, медьсодержащего типа, кодируется геном AWT59_1252. Все эти ферменты не имеют сигнальных пептидов и трансмембранных доменов и, вероятно, локализируются в цитоплазме.

Генетические детерминанты устойчивости к окислительному стрессу и высоким концентрациям металлов у *Ca. Gallionella acididurans*. Существенной проблемой для микроорганизма, живущего в аэробных условиях в присутствии высоких концентраций Fe(II) является защита от активных форм кислорода, образующихся в реакции перекиси водорода с Fe(II). Для защиты от окислительного стресса *Ca. Gallionella acididurans* может использовать две супероксид дисмутазы (AWT59_0023 и AWT59_2063) Fe/Mn типа, каталазу AWT59_2769 и гем-пероксидазу, которая может функционировать как каталаза или пероксидаза. Близкие гомологи каталазы AWT59_2769 в геномах представителей *Gallionellaceae* отсутствуют, но имеются у бета-протеобактерии *Polaromonas* sp. EUR3 1.2.1 и ряда дельта-протеобактерий из которых он вероятно был горизонтально перенесен в *Ca. Gallionella acididurans*.

Дренажные воды, в которых мы обнаружили новую бактерию, характеризуются высокими концентрациями таких тяжелых металлов, как цинк, а также кадмий, марганец и, в меньшей степени, медь и никель (табл. 2). Еще одним токсином является мышьяк, содержание которого составляет 3.9 мг/л. Его детоксификацию могут обеспечивать гены арсенатредуктазы *ArsC* (AWT59_0695) и кластер генов AWT59_1910-1908, кодирующих регулятор транскрипции *ArsR*, арсенатредуктазу *ArsC* и транспортер арсенита *ArsB*.

В геноме *Ca. Gallionella acididurans* присутствуют три Cu-транспортирующие АТФазы Р-типа (AWT59_0340, 0702, 3196). АТФаза (AWT59_0340) находится в непосредственной близости с генами, связанными с синтезом *cbh₃* цитохром *c*-оксидазы (AWT59_0341) и ее вспомогательных белков (AWT59_0338). Возможно, что ее функция заключается в транспорте меди в цитоплазму для сборки Cu-содержащей цитохром *c*-оксидазы. Аналогичные опероны синтеза *cbh₃* цитохром *c*-оксидазы, содержащие гены медь-транспортирующей АТФазы, присутствуют в геномах *S. lithotrophicus* ES-1 и *G. capsiferriformans* ES-2. Две дру-

гие медные АТРаза (AWT59_0702 и 3196) имеют гомологов в обоих родственных геномах. Однако ни одна из этих АТРаз не организована в оперон, содержащий также медный шаперон и регулятор транскрипции.

В геноме *Ca. Gallionella acididurans* кодируются механизмы устойчивости к металлам, отсутствующие у *G. capsiferriformans* ES-2 и *S. lithotrophicus* ES-1. Один из них – транспортер RND (resistance-nodulation-cell division) типа, переносящий медь и серебро за счет антипорта с протонами. RND-белки обычно функционируют в комплексе с MFP-белком (membrane fusion protein) CusB и OMF (outer membrane factor) CusC. Эти три белка образуют эффлюкс-комплекс, который может экспортировать катионы металлов из цитоплазмы или периплазмы через наружную мембрану. В геноме *Ca. Gallionella acididurans* гены двух RND комплексов находятся в непосредственной близости. Это RND CusA (AWT59_1169), MFP CusB (AWT59_1170) и OMF CusC (AWT59_1171). Вблизи этого кластера кодируется регулятор транскрипции – гистидинкиназа (AWT59_1167-1166). Второй комплекс, CusA (AWT59_1181), MFP CusB (AWT59_1180) и OMF CusC (AWT59_1179), кроме трех транспортеров содержит также металлошаперон CusF (AWT59_1178), который связывает медь в периплазме и передает на CusB (Songou et al., 2010). Учитывая то, что ближайшими родственниками всех белков являются таковые из *Burkholderia*, и за RND-комплексами в геноме *Ca. Gallionella acididurans* расположены две транспозазы (AWT59_1183 и 1184), можно предположить, что дополнительные механизмы устойчивости были перенесены из этой группы. Негомологичный CusA присутствует в геноме *G. capsiferriformans* ES-2. У *S. lithotrophicus* ES-1 Cus-транспортер не обнаружен.

У *Ca. Gallionella acididurans* присутствует несколько механизмов, позволяющих контролировать концентрацию кадмия и цинка. Один из них – RND-помпа CzcCBA (AWT59_2909-2907), связанная с эффлюкс-комплексом кобальта–кадмия–цинка. CzcA, вероятно, был получен путем горизонтального переноса от *Leptospirillum*, идентичность аминокислотных последовательностей составляет 83%. Также в геноме присутствуют два транспортера CzcD (AWT59_2914 и 3399), относящихся к группе cation diffusion facilitator, участвующие в транспорте кобальта, цинка и кадмия. *G. capsiferriformans* ES-2 и *S. lithotrophicus* ES-1 имеют только белок, гомологичный AWT59_2914. Ближайшим гомологом AWT59_3399 является белок из *Chthonomonas calidirosea* с идентичностью последовательностей 48%. У всех трех штаммов присутствовал транспортер CorC (AWT59_0524), участвующий в эффлюксе кобальта и магния. Наконец, в геноме *Ca. Gallionella acididurans* обнаружена транспортирующая двухвалентные катионы

АТРаза Р-типа (AWT59_1083), которая может принимать участие в эффлюксе кадмия. Гомологичные АТРаза присутствуют у ацидофильных обитателей дренажей: *Acidiphilium*, *Acidithiobacillus*, и *Acidocella*, однако ближайшими гомологами были соответствующие ферменты из *Burkholderia*.

Наряду с транспортом металлов из клетки, организмы могут использовать стратегию секвестирования токсичных ионов, например на полифосфатах. В геноме *Ca. Gallionella acididurans* присутствуют последовательности двух полифосфаткиназ (AWT59_0620 и 1098). PPK1 (AWT59_0620) присутствует также у *G. capsiferriformans* ES-2 и *S. lithotrophicus* ES-1, в то время как PPK2 (AWT59_1098) у ближайших родственников *G. acididurans* отсутствует.

В геноме *Ca. Gallionella acididurans* обнаружены механизмы, помогающие ацидофильным организмам поддерживать нейтральный pH цитоплазмы. В частности, транспортирующая K^+ АТРаза, KdpCBA (AWT59_3162-3164), создающая положительный заряд внутри цитоплазматической мембраны и, таким образом, препятствующая проникновению протонов в клетку. Интересно отметить, что АТРаза Kdp-типа отсутствует у *G. capsiferriformans* ES-2 и *S. lithotrophicus* ES-1, а ближайшим гомологом KdpC является белок из ацидофильной железooksисляющей бета-протеобактерии “*Ferrovum myxofaciens*”.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемое нами микробное сообщество развивается в условиях pH 2–3, типичного для кислых шахтных дренажей, но не столь экстремально низкого как в Richmond mine (ниже 1.5), в условиях низкой температуры (6.5°C) и высокого содержания ионов металлов. Поэтому обнаруженное нами небольшое разнообразие сообщества было вполне ожидаемым, но то, что доминирующим организмом в нем окажется бактерия рода *Gallionella* является неожиданным результатом. Бета-протеобактерии семейства *Gallionellaceae* являются типичными аэробными железooksисляющими бактериями, которых обнаруживают в пресноводных экосистемах с нейтральным значением pH (Hedrich et al., 2011). Эта группа включает бактерии родов *Gallionella*, *Sideroxydans*, *Ferriphaselus* и др. Их культивируемые представители растут при pH в диапазоне от 4 до 7.5 (Hanert, 2006). Однако последовательности генов 16S рРНК бактерий, близких к *Gallionellaceae*, обнаруживали при молекулярных исследованиях шахтных вод с более высокой кислотностью. Некультивируемые *Gallionellaceae* входили в число доминирующих групп микроорганизмов в дренажных водах (pH ~ 3): отвалов шахт в районе Carnoules во Франции (Bruneel et al., 2006); используемой для добычи пирита шахты Yunfu в Китае (pH 2.5) (He et al., 2007);

шахт в северном Уэльсе (рН 2.3–3) (Hallberg et al., 2006; Kimura et al., 2011). Бактерии, близкие к *Gallionella ferruginea*, были найдены в дренажных водах в районе урановой шахты Ronneburg (Германия), рН в которых находился в диапазоне от 2.7 до 6.3. Они составляли 69% микробного сообщества осадков при рН 4.4, но при рН 2.7 их доля снижалась до 6% (Fabisch et al., 2013).

В настоящей работе в результате использования метагеномных методов мы впервые определили нуклеотидную последовательность генома ацидотолерантного представителя рода *Gallionella*. Этот геном является композитным, т.е. представляет коллективный геном совокупности присутствующих в популяции близких штаммов. Эти штаммы генетически очень близки, о чем свидетельствует наличие в композитном геноме лишь 657 точечных однонуклеотидных полиморфизмов. По размеру и числу белок-кодирующих генов (3.4 Mb, 3525 генов) геном новой бактерии несколько превышает соответствующие показатели других представителей семейства *Gallionellaceae*, для которых известны геномные последовательности: *G. capsiferiformans* ES-2 (3.2 Mb, 3006 генов), *S. lithotrophicus* ES-1 (3.0 Mb, 3049 генов), *Ferriphaselus* OYT1 (2.7 Mb, 2639 генов) и *Ferriphaselus* R-1 (2.4 Mb, 2361 генов). Новая бактерия обладает более широкими возможностями метаболизма: в отличие от *G. capsiferiformans* ES-2 она обладает способностью окислять не только Fe(II), но и восстановленные соединения серы, имеет широкий спектр систем защиты от окислительного стресса, высоких концентраций металлов и протонов, обладает набором цитохромксидаз и RubisCO разного типа, которые могут функционировать в широком диапазоне концентраций кислорода. В отличие от других *Gallionellaceae*, новая бактерия обладает цитохромксидазой bo_3 типа, которая может функционировать при высоком содержании кислорода. Однако, в отличие от *S. lithotrophicus* ES-1 и *Ferriphaselus* OYT1, новая бактерия не обладает способностью к азотфиксации, на что указывает отсутствие генов нитрогеназы. Хотя возможность автотрофной фиксации атмосферного азота может быть важным признаком в экологических нишах с низким содержанием доступного азота, большинство членов микробных сообществ кислых шахтных дренажей не обладают способностью к азотфиксации и получают азот в виде аммония, образуемого другими членами сообщества и поступающего из окружающей среды и/или образующегося в результате восстановления нитрата и нитрита. Геном новой *Gallionella* содержит как гены транспортеров аммония, так и гены нитрат/нитритредуктаз, что вероятно, позволяет решить проблему обеспечения клеток фиксированным азотом. Надо также учитывать тот факт, что при добыче руды открытым способом большое

количество техногенных восстановленных соединений азота поступает со взрывчаткой.

Вероятной причиной отсутствия архей порядка *Thermoplasmatales* и бактерий *Leptospirillum* могут быть низкая температура и не экстремально низкий рН анализируемых дренажных вод. Оптимальные условия для развития *Gallionella*, по сравнению с другими типичными для кислых шахтных дренажей микроорганизмами, могут создаваться благодаря геохимическим условиям исследуемого объекта, предполагающим: постоянный приток содержащих восстановленные соединения железа и серы грунтовых вод; микроаэрофильные условия, обусловленные большой глубиной водной колонны по сравнению с площадью поверхности (глубина 11 м при диаметре шурфа 20 см) и флуктуации состава воды, в том числе рН, вследствие нерегулярного притока грунтовых вод, протекающих сквозь содержащую руду породу.

Важную роль в функционировании сообщества как целого могут играть его минорные члены. Автотрофом, способным окислять Fe(II) и восстановленные соединения серы, являются психротолерантный ацидофил *Acidithiobacillus ferrivorans*. Эта бактерия обладает способностью к азотфиксации (Liljeqvist et al., 2011). К числу автотрофов относятся и представители рода *Thiobacillus*, которые могут окислять соединения серы в аэробных или анаэробных условиях, в последнем случае они используют в качестве акцептора электронов нитрат (Beller et al., 2011). Гетеротрофную часть сообщества представляют альфа-протеобактерии рода *Acidisphaera* и ацидобактерии рода *Acidobacterium*. Гетеротрофы могут играть важную роль в экосистеме, удаляя из среды ингибирующие рост железокисляющих автотрофных бактерий органические соединения (Bacelar-Nicolau, Johnson, 1999). Небольшую часть сообщества составляют представители некультивируемой линии дельта-протеобактерий. Близкие к ней последовательности 16S рРНК (97–99% идентичность) были детектированы в различных кислых дренажах. Следует отметить идентификацию по генам рибосомной РНК эукариотического организма – гриба *Articulospora tetracladia*. Этот аскомицет широко распространен в водных экосистемах (Seena et al., 2012) и также представляет гетеротрофную часть микробного сообщества.

Филогенетический анализ обнаруженной нами новой бактерии, основанный как на анализе последовательностей генов 16S рРНК, так и рибосомных белков, показал ее принадлежность к роду *Gallionella*, в котором она представляет новый вид. Близкие последовательности генов 16S рРНК “некультивируемых” бактерий были идентифицированы при молекулярных исследованиях микробных сообществ кислых шахтных дренажей в различных регионах мира.

На основе геномных данных мы предлагаем описать новый вид как *Candidatus Gallionella acididurans* ShG14-8. Новый микроорганизм является аэробным железокисляющим хемолитоавтотрофом. Его особенностями по сравнению с другими представителями рода *Gallionella* являются устойчивость к низким значениям pH среды, высоким концентрациям металлов и способность окислять восстановленные соединения серы.

Описание “*Candidatus Gallionella acididurans*”.

Предлагаемая таксономическая классификация описанной группы бактерий – “*Candidatus Gallionella acididurans*” ShG14-8.

Gallionella acididurans sp. nov. (a.ci.di. du'rans. N.L. neut. n. acidium acid, L. part. adj. durans resist-ing, N.L. part. adj. acididurans acid-resisting). Не культивируван. Обнаружен в кислом шахтном дренаже (pH ~2.65) с температурой 6.5°C и высоким окислительно-восстановительным потенциалом (*Eh* +447 mV). Предположительно грамтрицательный, подвижный, способен расти хемолитоавтотрофно, окисляя Fe(II) и восстановленные соединения серы в аэробных условиях, фиксирует CO₂ в цикле Кальвина, не способен фиксировать N₂. Представлен композитным геномом (GenBank Acc. No. LSLI00000000), полученным из метабенома кислых дренажных вод скважины ShG14-8 в заброшенном карьере по добыче олова на месторождении Шерловая Гора (Читинская область, Россия).

Авторы выражают благодарность д-ру Дэвиду Бэнксу (Геологическая Служба Великобритании) за проведение элементного анализа образца воды. Работа выполнена с использованием научного оборудования ЦКП “Биоинженерия” при поддержке Минобрнауки (соглашение № 14.575.21.0067 от 07.08.2014 г., уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI57514X0067).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Абрамов Б.Н. Условия формирования и рудоносность флюидно-эксплозивных брекчий Шерловгорского оловополиметаллического месторождения (Восточное Забайкалье) // Вестник Томского гос. ун-та. 2011. № 345. С. 195–198.

Кулагашев А.И. О магматогенных брекчиях Шерловой горы и связанной с ними рудной минерализации // Материалы III научной конференции ЗабНИИ. Чита. 1968. С. 60–71.

Alneberg J., Vjarnason B.S., de Bruijn I., Schirmer M., Quick J., Ijaz U.Z., Lahti L., Loman N.J., Andersson A.F., Quince C. Binning metagenomic contigs by coverage and composition // Nat. Methods. 2014. V. 11. P. 1144–1146.

Arsène-Ploetze F., Koechler S., Marchal M., Coppée J.-Y., Chandler M., Bonnefoy V., Brochier-Armanet C., Barakat M., Barbe V., Battaglia-Brunet F., Bruneel O., Bryan C.G., Cleiss-Arnold J., Cruveiller S., Erhardt M., Heinrich-Salmeron A., Hommais F., Joulian C., Krin E., Lieutaud A.,

Lièvreumont D., Michel C., Muller D., Ortet P., Proux C., Siguier P., Roche D., Rouy Z., Salvignol G., Slyemi D., Talla E., Weiss S., Weissenbach J., Médigue C., Bertin P.N. Structure, function, and evolution of the *Thiomonas* spp. genome // PLoS Genet. 2010. V. 6. P. e1000859.

Bacelar-Nicolau P., Johnson D.B. Leaching of pyrite by acidophilic heterotrophic iron-oxidizing bacteria in pure and mixed cultures // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 585–590.

Badger M.R., Bek E.J. Multiple Rubisco forms in proteobacteria: their functional significance in relation to CO₂ acquisition by the CBB cycle // J. Exp. Bot. 2008. V. 59. P. 1525–1541.

Baker B.J., Banfield J.F. Microbial communities in acid mine drainage // FEMS Microbiol. Ecol. 2003. V. 44. P. 139–152.

Baker B.J., Comolli L.R., Dick G.J., Hauser L.J., Hyatt D., Dill B.D., Land M.L., Verberkmoes N.C., Hettich R.L., Banfield J.F. Enigmatic, ultrasmall, uncultivated archaea // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 8806–8811.

Barco R.A., Emerson D., Sylvan J.B., Orcutt B.N., Meyers M.E.J., Ramirez G.A., Zhong J.D., Edwards K.J. New insight into microbial iron oxidation as revealed by the proteomic profile of an obligate iron-oxidizing chemolithoautotroph // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. P. 5927–5937.

Beller H.R., Chain P.S.G., Letain T.E., Chakicherla A., Larimer F.W., Richardson P.M., Coleman M., Wood A.P., Kelly D.P. The genome sequence of the obligate chemolithoautotrophic, facultatively anaerobic bacterium *Thiobacillus denitrificans* // J. Bacteriol. 2006. V. 188. P. 1473–1488.

Bonnefoy V., Holmes D.S. Genomic insights into microbial iron oxidation and iron uptake strategies in extremely acidic environments // Environ. Microbiol. 2012. V. 14. P. 1597–1611.

Borisov V.B., Gennis R.B., Hemp J., Verkhovskiy M.I. The cytochrome *bd* respiratory oxygen reductases // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1807. P. 1398–1413.

Bruneel O., Duran R., Casiot C., Elbaz-Poulichet F., Personne J.C. Diversity of microorganisms in Fe-As-rich acid mine drainage waters of Carnoules, France // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 551–556.

Chen L.X., Hu M., Huang L.N., Hua Z.S., Kuang J.L., Li S.J., Shu W.S. Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses of microbial communities in acid mine drainage // ISME J. 2015. V. 9. P. 1579–1592.

Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R.J., Kulam-Syed-Mohideen A.S., McGarrell D.M., Marsh T., Garrity G.M., Tiedje J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37. P. 141–145.

Conroy O., Kim E.-H., McEvoy M.M., Rensing C. Differing ability to transport nonmetal substrates by two RND-type metal exporters // FEMS Microbiol. Lett. 2010. V. 308. P. 115–122.

Dick G.J., Andersson A.F., Baker B.J., Simmons S.L., Thomas B.C., Yelton A.P., Banfield J.F. Community-wide analysis of microbial genome sequence signatures // Genome Biol. 2009. V. 10. P. R85.

Emerson D., Field E.K., Chertkov O., Davenport K.W., Goodwin L., Munk C., Nolan M., Woyke T. Comparative genomics of freshwater Fe-oxidizing bacteria: implications for

- physiology, ecology, and systematics // *Front. Microbiol.* 2013. V. 12. P. 254.
- Fabisch M., Beulig F., Akob D.M., Kusel K. Surprising abundance of *Gallionella*-related iron oxidizers in creek sediments at pH 4.4 or at high heavy metal concentrations // *Front. Microbiol.* 2013. V. 4. P. 390.
- Ghosh W., Dam B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea // *FEMS Microbiol. Rev.* 2009. V. 33. P. 999–1043.
- Golyshina O.V., Pivovarova T.A., Karavaiko G.I., Kondrateva T.F., Moore E.R., Abraham W.R., Lunsdorf H., Timmis K.N., Yakimov M.M., Golyshin P.N. *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000. V. 50. P. 997–1006.
- Hallberg K.B., Coupland K., Kimura S., Johnson D.B. Macroscopic streamer growths in acidic, metal-rich mine waters in north wales consist of novel and remarkably simple bacterial communities // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 2022–2030.
- Hanert H.H. The genus *Gallionella* // *The Prokaryotes* / Eds. Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H. New York: Springer-Verlag, 2006. P. 990–995.
- He Z., Xiao S., Xie X., Zhong H., Hu Y., Li Q., Gao F., Li G., Liu J., Qiu G. Molecular diversity of microbial community in acid mine drainages of Yunfu sulfide mine // *Extremophiles.* 2007. V. 11. P. 305–314.
- Hedrich S., Schlomann M., Johnson D.B. The iron-oxidizing proteobacteria // *Microbiology.* 2011. V. 157. P. 1551–1564.
- Johnson B.D., Hallberg K.B. The microbiology of acidic mine waters // *Research in Microbiology.* 2003. V. 154. P. 466–473.
- Kato S., Nakawake M., Ohkuma M., Yamagishi A. Distribution and phylogenetic diversity of *cbbM* genes encoding RubisCO form II in a deep-sea hydrothermal field revealed by newly designed PCR primers // *Extremophiles.* 2012. V. 16. P. 277–283.
- Kato S., Ohkuma M., Powell D.H., Krepski S.T., Oshima K., Hattori M., Shapiro N., Woyke T., Chan C.S. Comparative genomic insights into ecophysiology of neutrophilic, microaerophilic iron oxidizing bacteria // *Front. Microbiol.* 2015. V. 13. P. 1265.
- Kimura S., Bryan C.G., Hallberg K.B., Johnson D.B. Biodiversity and geochemistry of an extremely acidic, low-temperature subterranean environment sustained by chemolithotrophy // *Environ. Microbiol.* 2011. V. 13. P. 2092–2104.
- Liljeqvist M., Valdes J., Holmes D.S., Dopson M. Draft genome of the psychrotolerant acidophile *Acidithiobacillus ferrivorans* SS3 // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. P. 4304–4305.
- Liu J., Wang Z., Belchik S.M., Edwards M.J., Liu C., Kennedy D.W., Merkley E.D., Lipton M.S., Butt J.N., Richardson D.J., Zachara J.M., Fredrickson J.K., Rosso K.M., Shi L. Identification and characterization of MtoA: a decaheme c-type cytochrome of the neutrophilic Fe(II)-oxidizing bacterium *Sideroxydans lithotrophicus* ES-1 // *Front. Microbiol.* 2012. V. 3. P. 37.
- McLean J.S., Lombardo M.J., Badger J.H., Edlund A., Novotny M., Yee-Greenbaum J., Vyahhi N., Hall A.P., Yang Y., Dupont C.L., Ziegler M.G., Chitsaz H., Allen A.E., Yooseph S., Tesler G., Pevzner P.A., Friedman R.M., Neilson K.H., Venter J.C., Lasken R.S. Candidate phylum TM6 genome recovered from a hospital sink biofilm provides genomic insights into this uncultivated phylum // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. E2390–2399.
- Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.-P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // *BMC Bioinformatics.* 2013. V. 14. P. 60.
- Méndez-García C., Peláez A.I., Mesa V., Sánchez J., Golyshina O.V., Ferrer M. Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats // *Front. Microbiol.* 2015. V. 29. P. 475.
- Meyer F., Paarmann D., D'Souza M., Olson R., Glass E.M., Kubal M., Paczian T., Rodriguez A., Stevens R., Wilke A., Wilkening J., Edwards R.A. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes // *BMC Bioinformatics.* 2008. V. 19. P. 386.
- Moya-Beltran A., Cardenas J.P., Covarrubias P.C., Issotta F., Ossandon F.J., Grail B.M., Holmes D.S., Quatrini R., Johnson D.B. Draft genome sequence of the nominated type strain of “*Ferrovum myxofaciens*,” an acidophilic, iron-oxidizing betaproteobacterium // *Genome Announc.* 2014. V. 2. P. e00834–14.
- Refojo P.N., Teixeira M., Pereira M.M. The Alternative complex III: properties and possible mechanisms for electron transfer and energy conservation // *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics.* 2012. V. 1817. P. 1852–1859.
- Seena S., Duarte S., Pascoal C., Cássio F. Intraspecific variation of the aquatic fungus *Articulospora tetracladia*: an ubiquitous perspective // *PLoS One.* 2012. V. 7. P. e35884.
- Senko J.M., Wanjugi P., Lucas M., Bruns M.A., Burgos W.D. Characterization of Fe(II) oxidizing bacterial activities and communities at two acidic Appalachian coalmine drainage-impacted sites // *ISME J.* 2008. V. 2. P. 1134–1145.
- Talavera G., Castresana J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments // *Syst. Biol.* 2007. V. 56. P. 564–577.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. Evol.* 2011. V. 28. P. 2731–2739.
- Travisany D., Di Genova A., Sepulveda A., Bobadilla-Fazzini R.A., Parada P., Maass A. Draft genome sequence of the *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* Cutipay strain, an indigenous bacterium isolated from a naturally extreme mining environment in Northern Chile // *J. Bacteriol.* 2012. V. 194. P. 6327–6328.
- Tseng C.P., Albrecht J., Gunsalus R.P. Effect of microaerophilic cell growth conditions on expression of the aerobic (cyoABCDE and cydAB) and anaerobic (narGHJI, frdABCD, and dmsABC) respiratory pathway genes in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. P. 1094–1098.
- Tyson G.W., Chapman J., Hugenholtz P., Allen E.E., Ram R.J., Richardson P.M., Solovyev V.V., Rubin E.M., Rokhsar D.S., Banfield J.F. Community structure and metabolism

through reconstruction of microbial genomes from the environment // *Nature*. 2004. V. 428 (6978). P. 37–43.

Valdes J., Pedroso I., Quatrini R., Dodson R.J., Tettelin H., Blake R. Eisen J.A., Holmes D.S. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications // *BMC Genomics*. 2008. V. 9. P. 597.

Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // *Curr. Prot. Mol. Biol.* 1987. P. 2.4.1–2.4.5.

Zhu W., Lomsadze A., Borodovsky M. *Ab initio* gene identification in metagenomic sequences // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38. P. 132.

A Novel Uncultured Bacterium of the Family *Gallionellaceae*: Description and Genome Reconstruction Based on the Metagenomic Analysis of Microbial Community in Acid Mine Drainage

V. V. Kadnikov¹, D. A. Ivasenko², A. V. Beletsky¹, A. V. Mardanov¹, E. V. Danilova³,
N. V. Pimenov⁴, O. V. Karnachuk², and N. V. Ravin¹, *

¹*Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

²*Tomsk State University, Tomsk, Russia*

³*Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, Russia*

⁴*Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*e-mail: nravin@biengi.ac.ru

Received December 30, 2015

Abstract—Drainage waters at the metal mining areas often have low pH and high content of dissolved metals due to oxidation of sulfide minerals. Extreme conditions limit microbial diversity in such ecosystems. A drainage water microbial community (6.5°C, pH 2.65) in an open pit at the Sherlovaya Gora polymetallic open-cast mine (Transbaikal region, Eastern Siberia, Russia) was studied using metagenomic techniques. Metagenome sequencing provided information for taxonomic and functional characterization of the microbial community. The majority of microorganisms belonged to a single uncultured lineage representing a new *Betaproteobacteria* species of the genus *Gallionella*. While no acidophiles are known among the cultured members of the family *Gallionellaceae*, similar 16S rRNA gene sequences were detected in acid mine drainages. Bacteria of the genera *Thiobacillus*, *Acidobacterium*, *Acidisphaera*, and *Acidithiobacillus*, which are common in acid mine drainage environments, were the minor components of the community. Metagenomic data were used to determine the almost complete (3.4 Mb) composite genome of the new bacterial lineage designated *Candidatus Gallionella acididurans* ShG 14-8. Genome analysis revealed that Fe(II) oxidation probably involved the cytochromes localized on the outer membrane of the cell. The electron transport chain included NADH dehydrogenase, a cytochrome *bc1* complex, an alternative complex III, and cytochrome oxidases of the *bd*, *cbb3*, and *bo3* types. Oxidation of reduced sulfur compounds probably involved the Sox system, sulfide–quinone oxidoreductase, adenylyl sulfate reductase, and sulfate adenylyltransferase. The genes required for autotrophic carbon assimilation via the Calvin cycle were present, while no pathway for nitrogen fixation was revealed. High numbers of RND metal transporters and P type ATPases were probably responsible for resistance to heavy metals. The new microorganism was an aerobic chemolithoautotroph of the group of psychrotolerant iron- and sulfur-oxidizing acidophiles of the family *Gallionellaceae*, which are common in acid mine drainages.

Keywords: acid mine drainage, metagenome, iron oxidation, *Gallionella*