

**ФИЗИОЛОГИЯ И ГЕНОМНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БАКТЕРИИ  
*GEOTOGA PETRAEA*, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО  
НЕФТЯНОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ (РОССИЯ)**© 2019 г. Е. М. Семенова<sup>а</sup>, Д. С. Груздев<sup>б</sup>, Т. П. Турова<sup>а</sup>, Т. Н. Назина<sup>а</sup> \*<sup>а</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия<sup>б</sup>Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: nazina@inmi.ru

Поступила в редакцию 19.06.2019 г.

После доработки 17.07.2019 г.

Принята к публикации 29.07.2019 г.

Бактерии порядка *Thermotogales* часто встречаются в высокотемпературных нефтяных пластах. Они обладают характерным наружным чехлом “тогой”. Бактерии рода *Geotoga* были выделены пока только из нефтяных пластов, представлены тремя штаммами, геномы которых не секвенированы, и имеется мало сведений об их внутривидовом фенотипическом разнообразии. Накопительная культура, анаэробно растущая на нефти, была получена из пластовой воды Восточно-Анзирского нефтяного месторождения (Россия). Методом высокопроизводительного секвенирования V3–V4 региона гена 16S рРНК в накопительной культуре были выявлены бактерии родов *Tangfeifania* (51% от общего числа последовательностей), *Halanaerobium* (36%), *Arcobacter* (10%) и *Geotoga* (3%). Из культуры был выделен штамм HO-Geo1, принадлежащий к известному виду *Geotoga petraea* (99.2% сходства генов 16S рРНК). Штамм представлен подвижными палочками, окруженными чехлом; растет анаэробно, сбраживает углеводы и белки с образованием уксусной кислоты, H<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub>, восстанавливает тиосульфат и элементарную серу до сероводорода. В чистой культуре штамм не растет на нефти. Рост в широком интервале температуры (24–55°C, оптимум 47–50°C) и солёности (0.2–140 г/л, оптимум 20–40 г/л) объясняет его обитание в низкотемпературном нефтяном пласте с высокоминерализованной пластовой водой. Геном штамма HO-Geo1, размером ~2.15 Мб, включает 2.057 генов, большинство из которых вовлечено в метаболизм белков, аминокислот и углеводов. Высокая галотолерантность штамма HO-Geo1 обусловлена присутствием генов адаптации к гиперосмотическому стрессу. Образование H<sub>2</sub> детерминировано наличием генов всех четырех субъединиц НАДФ-зависимой дегидрогеназы. Вероятно, в нефтяном пласте бактерии рода *Geotoga* используют микробную биомассу и продукты биodeградации нефти, образуемые другими микроорганизмами, и способствуют коррозии металлического нефтепромышленного оборудования.

**Ключевые слова:** нефтяные пласты, высокопроизводительное секвенирование, ген 16S рРНК, геном, *Geotoga petraea*

**DOI:** 10.1134/S002636561906017X

Микробные сообщества нефтяных пластов интенсивно изучаются в связи с их участием в биodeградации нефти, коррозии металлического нефтяного оборудования и возможностью применения в биотехнологиях повышения нефтеотдачи (Magot et al., 2000; Head et al., 2003; Gray et al., 2010; Liang et al., 2016). С использованием молекулярно-биологических методов, включая метагеномный анализ, получена обширная информация о составе микробных сообществ нефтяных пластов и их потенциальной активности (Bonch-Osmolovskaya et al., 2003; Li et al., 2017). Основным источником органического вещества для микроорганизмов нефтяных пластов является органическое вещество нефти и растворимые в пла-

стовой воде соединения, в том числе жирные кислоты, ароматические и нафтенновые соединения и др. (Magot et al., 2000). Представители порядка *Thermotogales* являются обычными обитателями высокотемпературных нефтяных пластов (Magot et al., 2000; Gray et al., 2010). Основными субстратами для их роста являются сахара или сложные белковые соединения, поэтому остается неясным их место в микробной пищевой цепи в нефтяном пласте. В ходе метагеномного анализа проб пластовой воды из нефтяного месторождения на Аляске показано, что с увеличением температуры пласта снижается разнообразие микробного сообщества и потенциал биodeградации нефти (Hu et al., 2016). Нуклеотидные последовательности

представителей порядка *Thermotogales* составляли около 1% от общего количества выявленных последовательностей. Реконструированный геном бактерии рода *Thermotoga* включал Fe-содержащую гидрогеназу, и авторы рассматривают термотог в качестве кандидатов на образование молекулярного водорода в подземном сообществе.

Порядок *Thermotogales* объединяет анаэробные органотрофные термофильные неспорообразующие палочковидные бактерии, окруженные наружным чехлом или “тогой”. Большинство представителей порядка способны сбрасывать широкий ряд субстратов с образованием молекулярного водорода, а также восстанавливать тиосульфат и элементную серу до сероводорода. Гипертермофильные и умеренно термофильные термотоги выделены из разных местообитаний, таких как горячие источники, морские гидротермальные венты и нефтяные пласты. Из нефтяных пластов выделены и описаны бактерии родов *Geotoga* (Davey et al., 1993), *Petrotoga* (Davey et al., 1993; Lien et al., 1998; Miranda-Tello et al., 2007), *Thermotoga* (Fardeau et al., 1997), *Kosmotoga* (DiPippo et al., 2009), *Oceanotoga* (Jayasinghearachchi, Lal, 2011) и *Pseudothermotoga* (Bhandari, Gupta, 2014). Причем бактерии родов *Geotoga* и *Petrotoga* пока выделены только из нефтяных пластов, и вероятно, являются аборигенными обитателями этих подземных экосистем. В момент написания настоящей статьи род *Geotoga* включал всего 2 вида, *G. petraea* и *G. subterranea* (Davey et al., 1993). Геотогги являются умеренными термофилами с оптимумом роста при 50 и 45°C соответственно, способными расти при повышенной солености среды до 100 г NaCl/л. В составе рода описаны всего три штамма; геномы типовых штаммов *G. petraea* и *G. subterranea* пока не секвенированы, и мало сведений о внутривидовом фенотипическом разнообразии.

При микроскопировании накопительных культур, анаэробно растущих на нефти, выделенных из низкотемпературного Восточно-Анзирского нефтяного месторождения, встречались палочковидные клетки с чехлом, характерным для термотог.

Целью настоящей работы было изучить филогенетическое разнообразие анаэробной накопительной культуры, полученной из пластовой воды низкотемпературного нефтяного месторождения, выделить чистую культуру бактерий порядка *Thermotogales*, определить ее таксономическое положение, физиологию и геномные характеристики.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объект исследования.** Пробы пластовой воды были отобраны в июне 2016 г. из добывающей скважины 245D Восточно-Анзирского нефтяного месторождения (г. Набережные Челны, Татарстан, Россия). Месторождение разрабатывается с

применением заводнения, в пласт нагнетается пресная вода, смешанная с пластовой высокоминерализованной водой хлоридно-натриевого типа, оставшейся после сепарации нефти. В результате общая соленость пластовой воды в пласте снижается с 186–245 до 12–72 г/л, pH 6.3. Скорость сульфатредукции в пробе пластовой воды из скважины 245D составляла 1982 нг S<sup>2-</sup>/(л сут), скорость метаногенеза из меченых NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> и 2-<sup>14</sup>C-ацетата составляла 9045 и 0 нл CH<sub>4</sub>/(л сут) соответственно (Назина и соавт., 2017).

**Состав сред и условия культивирования.** Накопительную культуру НО-245D получали путем посева пластовой воды из скважины 245D в минеральную среду Зейкуса (Zeikus et al., 1975) со стерильной нефтью (0.5% об./об.), микроэлементами (Pfennig, Lippert, 1966) и дрожжевым экстрактом (0.5 г/л). Среду готовили в 100 мл стеклянных флаконах, заполненных 50 мл среды и герметично закрытых резиновыми пробками и металлическими колпачками. В качестве газовой фазы использовали аргон. Культивировали при температуре 28°C в стационарных условиях в темноте. Чистую культуру выделяли путем посева анаэробной накопительной культуры в среде RM следующего состава (г/л дистиллированной воды): NaCl – 20.0; MgCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O – 18.0; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 3.0; CaCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O – 1.5; KCl – 0.5; NH<sub>4</sub>Cl – 0.33; NaHCO<sub>3</sub> – 0.2; дрожжевой экстракт – 1.0; пептон – 5.0; цитрат железа – 0.02; Na<sub>2</sub>S · 9H<sub>2</sub>O – 0.2; 1 мл раствора микроэлементов (Pfennig, Lippert, 1966); pH 6.8–7.0. Среду готовили в пробирках Хангейта, аргон служил газовой фазой. Штамм НО-Geo1 выделяли методом последовательных пересевов культуры из наибольшего разведения в жидкую среду RM; посева инкубировали при 47°C. Использование разных источников углерода определяли на среде RM (без пептона и цитрата железа), содержащей дрожжевой экстракт (0.2 г/л). Сахара, пептон, триптон, дрожжевой экстракт вносили в концентрации 0.5% (вес/об.), спирты, соли органических кислот – 0.2% (вес/об.), аминокислоты – 0.1–0.2% (вес/об.). Контролем служила инокулированная среда, но без соответствующего субстрата. В качестве акцепторов электронов использовали тиосульфат натрия (3.2 г/л) и элементную серу (10.0 г/л). Оптимум и интервалы солености для роста определяли в среде RM, содержащей: 0.5, 2, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 и 15.0% (вес/об.) NaCl. Рост при разной температуре определяли в среде RM, содержащей 2.0% (вес/об.) NaCl после инкубирования в течение 7 сут. Рост определяли по наличию молекулярного водорода в газовой фазе, изменению количества белка в среде, образованию сероводорода и летучих кислот, а также микроскопированием. Спектр используемых субстратов и образуемых штаммом ферментов анализировали также с помощью наборов API 50CH и API ZYM (“Biomérieux”, France), соглас-

но инструкции производителя. Штамм HO-Geo1 депонирован во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов (ВКМ В-3300).

**Микроскопические методы.** Морфологию клеток изучали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Axio Imager.D1 (“Carl Zeiss”, Германия) с цифровой камерой Axio Cam HRC и компьютерным программным обеспечением Axio Vision. Ультратонкую структуру клеток изучали, как описано в статье (Назина, Пивоварова, 1979). Срезы просматривали в просвечивающем электронном микроскопе JEM-100C (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 kV.

**Аналитические методы.** Молекулярный водород, азот и метан в газовой фазе определяли хроматографическим методом; сероводород определяли колориметрически по методу Пахмайра с N,N-диметил-р-фенилендиамином, как описано ранее (Назина и соавт., 2017). Летучие кислоты и низшие спирты анализировали на газовом хроматографе Shimadzu GC 2010 Plus (Япония) с колонкой Zebron ZB-FFAP (30 м × 0.32 мм × 0.25 мкм). Анализ проводили с программированием температуры на колонке от 40 до 150°C, со скоростью изменения 10°C/мин. Температура испарителя и детектора составляла 250°C. В качестве газа-носителя использовали гелий, который подавали со скоростью 34 мл/мин.

**Выделение ДНК, амплификация и секвенирование.** ДНК из накопительной культуры HO-245D и из чистой культуры выделяли стандартным методом (Maniatis et al., 1982). Для определения чистоты культуры использовали стандартные бактериальные праймеры 8-27f и 1492g (Lane, 1991). Для получения библиотеки генов 16S рРНК накопительной культуры, выращенной на нефти, был амплифицирован V3–V4 гипервариабельный регион этого гена и на основе двойного баркодирования были приготовлены библиотеки, как описано ранее (Fadrosh et al., 2014). Смысловые участки праймеров были взяты в соответствии с парой праймеров Pro341F–Pro805R (Takahashi et al., 2014). Секвенирование проводили на платформе MiSeq (“Illumina”, США) с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles) (“Illumina”, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

**Биоинформатический анализ.** Полученные фрагменты генов 16S рРНК были обрезаны с использованием программ trimmomatic-0.36 по алгоритму SLIDINGWINDOW:4:15 (Bolger et al., 2014). Разные прочтения объединяли программой SeqPrep (<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>). Для обнаружения химер и демультиплексирования использовали фильтры Qiime (Caporaso et al., 2010). Последовательности с уровнем сходства ≥98% объединяли в операционные таксономические единицы (ОТЕ) и идентифицировали с ис-

пользованием онлайн-ресурса SILVA (Quast et al., 2014). Выравнивание последовательностей и филогенетическое дерево, включающее референтные последовательности генов 16S рРНК валидно описанных представителей семейства *Petrogaceae*, было выполнено с использованием пакета программ MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016) на основании neighbor-joining алгоритма.

Функциональный анализ был выполнен с использованием сервера RAST (Rapid Annotations using Subsystems Technology, v. 2.0) (Aziz et al., 2008) и сервиса BlastKoala (Kanehisa et al., 2016).

Последовательности гена 16S рРНК и генома штамма HO-Geo1 депонированы в базе данных NCBI под номерами MK984240 и SRME01000001.1 соответственно. Библиотека фрагментов генов 16S рРНК накопительной культуры HO-245D депонирована в NCBI, проект PRJNA548274.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Филогенетическое разнообразие накопительной культуры, анаэробно растущей на нефти.** Накопительную культуру HO-245D инкубировали в среде с нефтью при 28°C в стационарных условиях. После 7 мес. культивирования в газовой фазе был обнаружен молекулярный водород в концентрации около 3000 ppm, и в среде были детектированы уксусная (85 мг/л), пропионовая (21 мг/л) и изо-масляная (21 мг/л) кислоты. При микроскопировании культуры отмечено большое морфологическое разнообразие с преобладанием палочковидных клеток, различавшихся по длине, диаметру и подвижности, встречались клетки с чехлом. Накопительная культура HO-245D была исследована методом высокопроизводительного секвенирования гипервариабельного V3–V4 региона гена 16S рРНК. С использованием онлайн-ресурса SILVA было показано, что все полученные последовательности принадлежали представителям домена *Bacteria* и формировали 73 операционных таксономических единицы с уровнем сходства ≥98%. В полученной библиотеке преобладали последовательности бактерий филумов *Bacteroidetes* (род *Tangfeifania*, 51% последовательностей), *Firmicutes* (род *Halanaerobium*, 36%), *Proteobacteria* (класс *Epsilonproteobacteria*, род *Arcobacter*, 10%) и *Thermotogae* (род *Geotoga*, 3%) (табл. 1). Бактерии рода *Tangfeifania* (семейство *Prolixibacteraceae*) впервые были выделены из соленоводного озера и до настоящего времени в нефтяных пластах не обнаруживались (Liu et al., 2014). Род *Tangfeifania* представлен мезофильными, галотолерантными, факультативно-анаэробными бактериями, обладающими слабой ферментативной активностью, принадлежащими к одному виду *T. diversioriginum*. Анаэробных галоалкалофильных бактерий рода *Halanaerobium* часто обнаруживали в нефтяных пластах с высокоминерализованными водами, и показано их участие

**Таблица 1.** Филогенетическое разнообразие представителей домена *Bacteria* в анаэробной накопительной культуре НО-245D, полученной на нефти, определенное методом высокопроизводительного секвенирования ампликонов гена 16S рРНК

Филум, ближайший культивируемый родственник (% сходства генов 16S рРНК)	% от количества последовательностей в библиотеке*
<i>Bacteroidetes</i> , <i>Tangfeifania</i> (99)	51
<i>Firmicutes</i> , <i>Halanaerobium</i> (100)	36
<i>Proteobacteria</i> , <i>Epsilonproteobacteria</i> , <i>Arcobacter</i> (100)	10
<i>Thermotogae</i> , <i>Geotoga</i> (100)	3

\* Последовательности, составлявшие менее 0.1% от количества последовательностей в библиотеке, не учитывали.

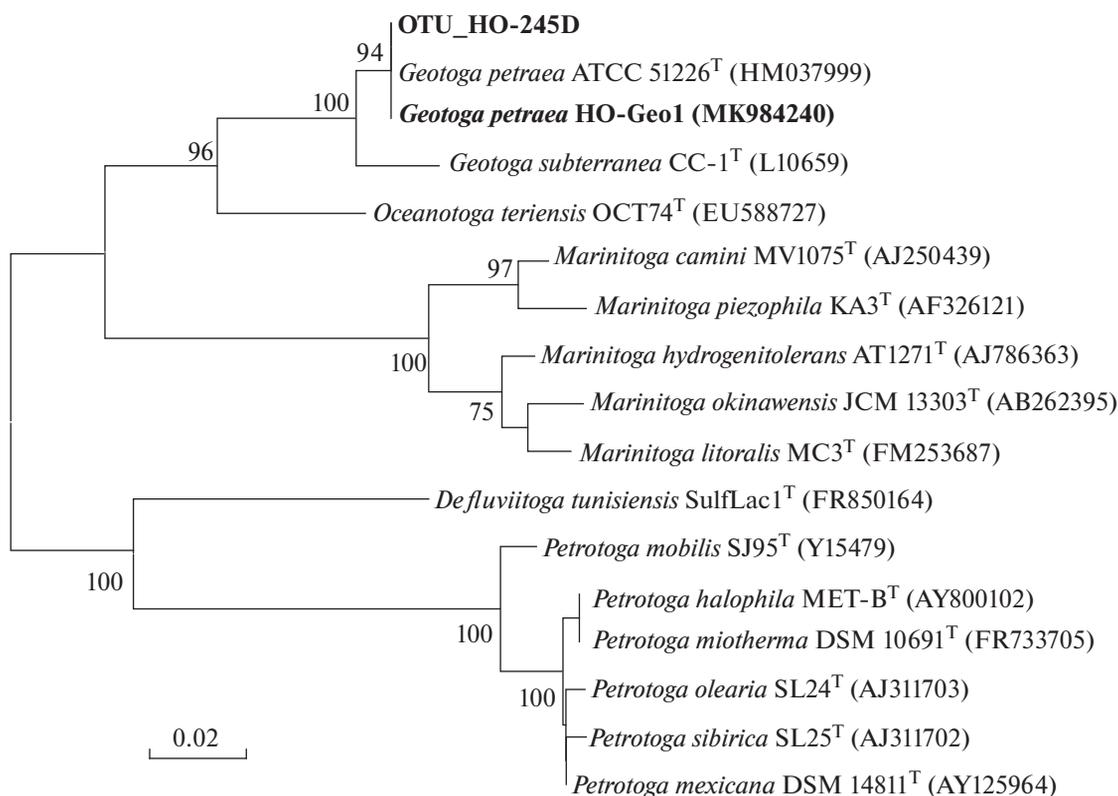
в образовании сероводорода и коррозии металлического оборудования (Ravot et al., 1997; Cluff et al., 2014; Liang et al., 2016). В геноме *Halanaerobium hydrogeniformans* определены гены, детерминирующие образование молекулярного водорода при сбраживании сахаров (Mormile, 2014). Бактерии рода *Arcobacter* также обнаруживали в составе микробных сообществ из месторождений нефти и газа (Evans et al., 2018). Род включает анаэробные и микроаэрофильные бактерии, способные к денитрификации и образованию сероводорода. Немногочисленные последовательности в библиотеке из накопительной культуры, растущей на нефти, принадлежали бактериям рода *Geotoga*, предложенного в статье (Davey et al., 1993). Эта статья остается единственной публикацией, посвященной описанию бактерий рода *Geotoga*. В связи с вышесказанным, была предпринята попытка выделить геотогу в чистую культуру.

**Выделение штамма НО-Geo1 и его морфологические и физиологические свойства.** Чистую культуру штамма НО-Geo1 получали методом десятикратных разведений в жидкой среде RM с пептоном и дрожжевым экстрактом. Поскольку известные геотоги являются термотолерантными бактериями с оптимальной температурой роста около 45–50°C, бактерии выделяли при 47°C, что помогло в очистке культуры. Чистоту культуры контролировали микроскопированием и методом анализа гена 16S рРНК. Последовательность гена 16S рРНК штамма НО-Geo1 имела 100% сходства с последовательностью OTU\_НО-245D из библиотеки накопительной культуры и 99.2% сходства с геном типового штамма *G. petraea* T5<sup>T</sup>, что позволило отнести выделенный штамм к этому виду (рис. 1). Осажденная биомасса чистой культуры имела светло-бежевый цвет. Клетки штамма НО-Geo1 были представлены палочками, размером 0.9–1.4 × 3.8–12.0 мкм, окруженными характерным чехлом – “тогой”, который незначительно расширял клетку (рис. 2а–2д). Клетки были подвижными в экспоненциальной фазе роста. В культуре встречались как одиночные клетки, так и цепочки до 5 клеток, объединенные общим чехлом. Штамм спор не образо-

вывал. В стационарной фазе наблюдались сферы, характерные для представителей порядка *Thermotogales* (рис. 2в).

Штамм НО-Geo1 рос в интервале рН среды от 6.0 до 8.0 (оптимум 6.5–7.0), в широком интервале температуры – от 24 до 55°C (оптимум 47–50°C) и солёности среды – от 0.2 до 140 г NaCl/л (оптимум 20–40 г/л) (рис. 3а, 3б; табл. 2). Штамм не нуждался в восстановителе и рос как в присутствии Na<sub>2</sub>S · 9H<sub>2</sub>O, так и без него. Внесение дрожжевого экстракта стимулировало рост.

С использованием тест-системы API Zym у штамма НО-Geo1 была выявлена активность ряда ферментов, включая щелочную фосфатазу, эстеразу (С4), липазу (С8), кислую фосфатазу, нафтол-AS-VI-фосфогидролазу, α- и β-галактозидазы, β-глюкуронидазу, α-глюкозидазу. Отрицательный результат был показан для липазы (С14), лейцин ариламидазы, валин ариламидазы, цистеин ариламидазы, трипсина, α-химотрипсина, β-глюкозидазы, N-ацетил-β-глюкозаминидазы, α-маннозидазы и α-фукозидазы. С использованием китов API 50CH было показано образование кислот из N-ацетилглюкозамина, D-, L-арабинозы, D-галактозы, D-глюкозы, 2,5-кетоглюконата калия, D-, L-ксилитозы, D-ликсозы, D-маннозы, D-рибозы, L-сорбозы, D-тагатозы, D-туранозы, D-фруктозы и эскулина. Кислоты штамм не образовывал из D-адонита, амигдалина, D-, L-арабита, арбутина, гентиобиозы, гликогена, глицерина, дульцита, инозита, инулина, глюконата калия, крахмала, ксилита, D-мальтозы, D-меллицитозы, метил-βD-ксилопиранозида, метил-αD-глюкопиранозида, метил-αD-маннопиранозида, D-маннита, L-рамнозы, салицина, D-сорбита, D-трегалозы, D-раффинозы и эритрита. Слабый рост отмечен на D-мелибиозе, D-, L-фукозе и D-целлобиозе. Кроме того, штамм НО-Geo1 использовал для роста дрожжевой экстракт, ксилан, лактозу, D-маннозу, пептон, сахарозу, триптон, этанол. Рост не наблюдался на аргинине, гистидине, глицине, лактате, лизине-HCl, метионине, орнитине и треонине. Показано образование сероводорода из тиосульфата и элементной серы при росте на рибозе или дрожжевом экстракте.



**Рис. 1.** Филогенетическое дерево, основанное на анализе последовательностей генов 16S рРНК нового штамма *G. petraea* HO-Geo1, идентичного ему филотипа из накопительной культуры HO-245D (NCBI SRA, проект PRJNA548274), анаэробно растущей на нефти, а также генов типовых штаммов видов рода *Geotoga* и других представителей семейства *Petrotogaceae*. Дерево построено с использованием алгоритма neighbor-joining. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 2 заменам на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана достоверность ветвления на основании “bootstrap”-анализа 100 альтернативных деревьев (значимыми признаются значения больше 75%).

Основные продукты брожения глюкозы включали уксусную кислоту, молекулярный водород и CO<sub>2</sub>; в зависимости от времени культивирования были зарегистрированы также в небольшом количестве ацетон, этанол, изопропанол, пропионовая, *n*-масляная и *изо*-валериановая кислоты (табл. 2).

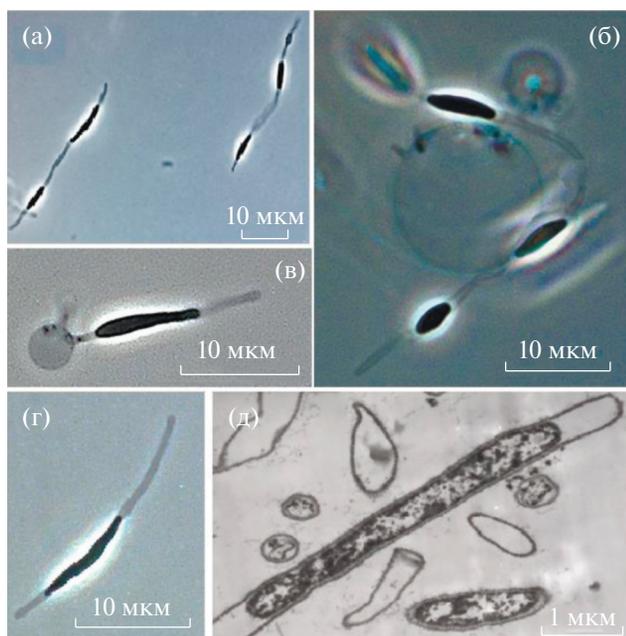
Проверен рост штамма HO-Geo1 в минеральной среде с нефтью и 45 г NaCl/л. После 90 сут инкубирования при 48°C была проанализирована фракция C<sub>10</sub>–C<sub>34</sub> алканов по сравнению с таковой в стерильном контроле. Какие-либо существенные изменения спектра не были выявлены (данные не представлены).

В настоящее время в базе данных GenBank отсутствует геном типового штамма *G. petraea* T5<sup>T</sup>. В составе имеющегося в GenBank генома *G. petraea* штамма WG14 (BioProject PRJEB15679) отсутствует ген 16S рРНК, позволяющий определить его таксономическую принадлежность, и нет какой-либо опубликованной информации об этом штамме. Учитывая вышесказанное, а также способность выделенного штамма HO-Geo1 продуцировать большое количество молекулярного во-

дорода при росте на разных субстратах в широком интервале температуры и солености, был секвенирован и аннотирован геном *G. petraea* HO-Geo1 (Grouzdev et al., 2019).

**Характеристика генома *G. petraea* HO-Geo1.** Геном *G. petraea* HO-Geo1 представлен 24 контигами, общим размером 2150220 п.н. (Г + Ц) состав, рассчитанный на основании геномной последовательности, составляет 29.4%. Число генов составило 2057, из них 1997 белок-кодирующих последовательностей. В геноме выявлено 52 гена РНК: 46 – тРНК, 3 – рРНК и 3 – нкРНК. В результате аннотирования генома *G. petraea* HO-Geo1 для большинства белок-кодирующих генов (76.8%) были предсказаны предполагаемые функции, а оставшиеся были аннотированы как гипотетические белки. Распределение генов между функциональными категориями COG (Clusters of Orthologous Groups) представлено в табл. 3.

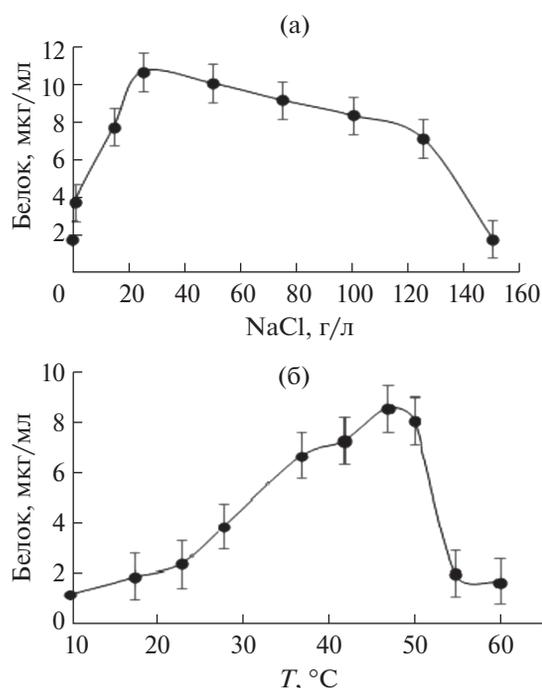
В последовательности генома *G. petraea* HO-Geo1 было обнаружено относительно большое количество генов, отнесенных к функциональным категориям COG, связанным с трансляцией, структурой и биогенезом рибосом (9.5%), транспортом и



**Рис. 2.** Морфология клеток штамма *G. petraea* HO-Geo1 (световой микроскоп Axio Imager.D1) (а–г) и ультратонкая структура клетки (д) (просвечивающий электронный микроскоп JEM-100C).

метаболизмом аминокислот (6.8%), углеводов (6.5%), производством и преобразованием энергии (5.6%), а также с механизмами передачи сигналов (5.6%). Дальнейший анализ генома *G. petraea* HO-Geo1 показал, что он содержит полный набор генов необходимых для функционирования пентозофосфатного и Эмбдена–Мейергофа–Парнаса путей. Кроме того, в геноме были идентифицированы гены деградации галактозы по пути Лелуара и биосинтеза гликогена. Цикл трикарбоновых кислот и путь Энтнера–Дудорова являются неполными. Бактерия *G. petraea* HO-Geo1 способна расщеплять такие субстраты, как ксилоза, манноза и лактоза, что согласуется с присутствием в его геноме множества генов, кодирующих расщепление углеводов. Образование водорода, вероятно, опосредовано участием НАДФ-зависимой дегидрогеназы. В геноме *G. petraea* был найден генный кластер, белки которого являлись гомологами субъединицам НАДФ-зависимой дегидрогеназы Hnd *Desulfovibrio fructosivorans* (табл. 4).

Высокая галотолерантность штамма HO-Geo1 обусловлена присутствием большого количества генов специализированных транспортеров осмопротекторов, связанных с классическими путями адаптации к гиперосмотическому стрессу: *proX* (E4650\_01075, E4650\_03990), *proW* (E4650\_03995), *proV* (E4650\_04000) и *opuA* (E4650\_05540), *opuBD* (E4650\_05535, E4650\_05545), *opuC* (E4650\_05360, E4650\_05850). Информация, полученная в ходе анализа геномных данных, согласуется с экспе-



**Рис. 3.** Рост штамма HO-Geo1 при разном содержании NaCl в среде (а) и температуре инкубирования (б).

риментальными результатами изучения фенотипических характеристик штамма HO-Geo1.

Сравнение основных диагностических признаков штамма HO-Geo1 и типового штамма *G. petraea* T5<sup>T</sup> показало, что штамм HO-Geo1 отличается отсутствием роста на крахмале и мальтозе и использованием ксилозы и этанола. Кроме того, *G. petraea* HO-Geo1 рос в более широком интервале температуры и солености среды, что объясняет его присутствие в низкотемпературном нефтяном пласте с высокоминерализованной пластовой водой. Отметим, что способность к росту в широком интервале температуры является особенностью как термофильных, так и мезофильных представителей порядка *Thermotogales*. Например, бактерия *Mesotoga infera*, выделенная из подземного хранилища газа, растет в интервале от 20 до 50°C с оптимумом при 37°C (Nesbø et al., 2012). Штамм HO-Geo1 не использовал *n*-алканы нефти. В геноме также практически отсутствовали гены деградации ароматических соединений. Вероятно, в нефтяном пласте штамм использует микробную биомассу и продукты биodeградации нефти, образуемые другими компонентами микробного сообщества. Молекулярный водород, образующийся *G. petraea* HO-Geo1, служит субстратом для микроорганизмов или в присутствии тиосульфата или серы используется на их восстановление до сероводорода. Таким образом, бактерии рода *Geotoga* осуществляют сопряжение циклов углеро-

**Таблица 2.** Диагностические признаки *G. petraea* HO-Geo1 и известных видов рода *Geotoga*

Признак	<i>G. petraea</i> HO-Geo1	<i>G. petraea</i> T5 <sup>T</sup>	<i>G. subterranea</i> CC-1 <sup>T</sup>
Размер клеток, мкм	0.9–1.4 × 3.8–12.0	0.6 × 3–20	0.5 × 4–7.5
Подвижность	+	+	+
Форма клеток	Палочки, до 5 клеток в цепочке, объединены чехлом	Палочки, до 5 клеток в цепочке, объединены чехлом	Палочки, одиночные или в парах, объединены чехлом
Образование сфер в стационарной фазе	+	+	+
Источники углерода для брожения:			
Ацетат	–	–	–
Галактоза	+	+	+
Глюкоза	+	+	+
Крахмал	–	+	+
Ксилоза	+	–	–
Лактат	–	–	–
Лактоза	+	+	+
Мальтоза	–	+	+
Манноза	+	+	+
Раффиноза	–	–	–
Сахароза	+	+	+
Этанол	+	–	–
Продукты брожения глюкозы	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , ацетат, изопропанол, <i>изо</i> -валерат, этанол, пропионат, <i>n</i> -бутират	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , ацетат, этанол	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , ацетат, этанол
Восстановление серы и тиосульфата до сероводорода	+	+	+
T, °C, min/opt/max	24/47–50/55	30/50/55	30/45/60
NaCl, min/opt/max, г/л	0.2/20–40/140	5/20/100	5/40/100
pH, min/opt/max	6.0/6.5–7.0/ 8.0	5.5/6.5/9.0	5.5/6.5/9.0
Г + Ц, мол. %	29.4	29.5	29.9
Источник выделения	Пластовая вода нефтяного месторождения (Татарстан, РФ)	Рассол нефтяного месторождения (Оклахома, Техас, США)	
Ссылка	Настоящая работа	Davey et al., 1993	

да и серы и могут способствовать коррозии металлического нефтепромышленного оборудования.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-00028). Субмикроскопическое строение клеток анализировали при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит материалов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

**Таблица 3.** Количество генов в геноме *Geotoga petraea* HO-Geo1, ассоциированных с основными функциональными категориями (COG)

Код COG	Количество	%	Описание COG
A	0	0.0	Процессинг и модификация РНК
B	2	0.1	Структура и динамика хроматина
C	111	5.6	Производство и преобразование энергии
D	22	1.1	Контроль клеточного цикла, деление клеток, разделение хромосом
E	136	6.8	Аминокислотный транспорт и метаболизм
F	72	3.6	Нуклеотидный транспорт и метаболизм
G	129	6.5	Транспорт и метаболизм углеводов
H	69	3.5	Транспорт и метаболизм коферментов
I	55	2.8	Транспорт и метаболизм липидов
J	190	9.5	Трансляция, структура и биогенез рибосом
K	95	4.8	Транскрипция
L	79	4.0	Репликация, рекомбинация и репарация
M	100	5.0	Клеточная стенка/мембрана
N	66	3.3	Клеточная подвижность
O	61	3.1	Посттрансляционная модификация, белковый метаболизм, шапероны
P	72	3.6	Транспорт и обмен неорганических ионов
Q	14	0.7	Биосинтез, транспорт и катаболизм вторичных метаболитов
R	160	8.0	Только общее предсказание функции
S	86	4.3	Функция неизвестна
T	112	5.6	Механизмы передачи сигнала
U	19	1.0	Внутриклеточный оборот, секреция и везикулярный транспорт
V	59	3.0	Защитные механизмы
W	0	0.0	Внеклеточные структуры
X	2	0.1	Мобилом: профаги, транспозоны
Z	0	0.0	Цитоскелет
	286	14.3	Не ассоциированы с COG

**Таблица 4.** Сравнение белков, потенциально ассоциированных с продукцией  $H_2$ , идентифицированных в геноме *Geotoga petraea* HO-Geo1 с субъединицами НАДФ-зависимой дегидрогеназы *Desulfotomaculum* DSM 3604

Белок	Метка NCBI Locus	<i>Desulfotomaculum</i> DSM 3604			
		покрытие, %	e-значение	идентичность, %	идентификатор NCBI
HndA	E4650_07980	88	2E-51	45.8	Q46505.1
HndB	E4650_07975	98	3E-27	37.2	Q46506.1
HndC	E4650_07970	81	0.0	63.6	Q46507.1
HndD	E4650_07965	100	0.0	57.6	Q46508.1

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Назина Т.Н., Пивоварова Т.А. Субмикроскопическая организация и спорообразование у *Desulfotomaculum*

*nigrificans* // Микробиология. 1979. Т. 48. № 2. С. 302–306.

- Nazina T.N., Pivovarova T.A. Submicroscopic organization and sporulation in *Desulfotomaculum nigrificans* // Microbiology (Moscow). 1979. V. 48. P. 302–306.
- Назина Т.Н., Соколова Д.Ш., Бабич Т.Л., Семенова Е.М., Еришов А.П., Биджиева С.Х., Борзенков И.А., Полтараус А.Б., Хисаметдинов М.Р., Турова Т.П. Микроорганизмы низкотемпературных месторождений тяжелой нефти (Россия) и возможность их применения для вытеснения нефти // Микробиология. 2017. Т. 86. № 6. С. 748–761.
- Nazina T.N., Sokolova D.Sh., Babich T.L., Semenova E.M., Ershov A.P., Bidzhieva S.Kh., Borzenkov I.A., Poltarau A.B., Khisametdinov M.R., Tourova T.P. Microorganisms of low-temperature heavy oil reservoirs (Russia) and their possible application for enhanced oil recovery // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 773–785.
- Aziz R.K., Bartels D., Best A., DeJongh M., Disz T., Edwards R.A., Formisma K., Gerdes S., Glass E.M., Kubal M., Meyer F., Olsen G.J., Olson R., Osterman A.L., Overbeek R.A., McNeil L.K., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Pusch G.D., Reich C., Stevens R., Vassieva O., Vonstein V., Wilke A., Zagnitko O. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology // BMC Genomics. 2008. 9:75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Bhandari V., Gupta R.S. Molecular signatures for the phylum (class) *Thermotogae* and a proposal for its division into three orders (*Thermotogales*, *Kosmotogales* ord. nov. and *Petrotogales* ord. nov.) containing four families (*Thermotogaceae*, *Fervidobacteriaceae* fam. nov., *Kosmotogaceae* fam. nov. and *Petrotogaceae* fam. nov.) and a new genus *Pseudothermotoga* gen. nov. with five new combinations // Antonie van Leeuwenhoek. 2014. V. 105. P. 143–168.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. 2014. V. 30. P. 2114–2120.
- Bonch-Osmolovskaya E.A., Miroshnichenko M.L., Lebedinsky A.V., Chernykh N.A., Nazina T.N., Ivoilov V.S., Belyaev S.S., Boulygina E.S., Lysov Yu.P., Perov A.N., Mirzabekov A.D., Hippe H., Stackebrandt E., L'Haridon S., Jeanthon C. Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 6143–6151.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nat. Methods. 2010. V. 7. P. 335–336.
- Cluff M.A., Hartsock A., Macrae J.D., Carter K., Mouser P.J. Temporal changes in microbial ecology and geochemistry in produced water from hydraulically fractured marcellus shale gas wells // Environ. Sci. Technol. 2014. V. 48. P. 6508–6517.
- Davey M.E., Wood W.A., Key R., Nakamura K., Stahl D.A. Isolation of three species of *Geotoga* and *Petrotoga*: two new genera, representing a new lineage in the bacterial line of descent distantly related to the “*Thermotogales*” // Syst. Appl. Microbiol. 1993. V. 16. P. 191–200.
- DiPippo J.L., Nesbø C.L., Dahle H., Doolittle W.F., Birkland N.-K., Noll K.M. *Kosmotoga olearia* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, anaerobic heterotroph isolated from an oil production fluid // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 2991–3000.
- Fadrosh D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // Microbiome. 2014. V. 2(1). P. 6. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-6>
- Fardeau M.-L., Ollivier B., Patel B.K.C., Magot M., Thomas P., Rimbault A., Rocchiccioli F., Garcia J.-L. *Thermotoga hypogea* sp. nov., a xylanolytic, thermophilic bacterium from an oil-producing well // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1997. V. 47. P. 1013–1019.
- Evans M.V., Panescu J., Hanson A.J., Welch S.A., Sheets J.M., Nastasi N., Daly R.A., Cole D.R., Darrah T.H., Wilkins M.J., Wrighton K.C., Mouser P.J. Members of *Marinobacter* and *Arcobacter* influence system biogeochemistry during early production of hydraulically fractured natural gas wells in the Appalachian Basin // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Article 2646. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02646>
- Gray N.D., Sherry A., Hubert C., Dolfing J., Head I.M. Methanogenic degradation of petroleum hydrocarbons in subsurface environments remediation, heavy oil formation, and energy recovery // Adv. Appl. Microbiol. 2010. V. 72. P. 137–161.
- Grouzdev D.S., Semenova E.M., Sokolova D.S., Tourova T.P., Poltarau A.B., Nazina T.N. Draft genome sequence of *Geotoga petraea* strain HO-Geo1, isolated from a petroleum reservoir in Russia // Microbiol. Resour. Announc. 2019. V. 8. Article e00706-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00706-19>
- Head I.M., Jones D.M., Larter S.R. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil // Nature. 2003. V. 426. P. 344–352. <https://doi.org/10.1038/nature02134>
- Hu P., Tom L., Singh A., Thomas B.C., Baker B.J., Piceno Y.M., Andersen G.L., Banfield J.F. Genome-resolved metagenomic analysis reveals roles for candidate phyla and other microbial community members in biogeochemical transformations in oil reservoirs // mBio. 2016. V. 7. Article e01669-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01669-15>
- Jayasinghearachchi H.S., Lal B. *Oceanotoga teriensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from offshore oil-producing wells // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2011. V. 61. P. 554–560.
- Kanehisa M., Sato Y., Morishima K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences // J. Mol. Biol. 2016. V. 428. P. 726–731.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. P. 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics / Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M. New York: John Wiley & Sons, 1991. P. 115–175.
- Li X.X., Mbandinga S.M., Liu J.F., Zhou L., Yang S.Z., Gu J.D., Mu B.Z. Microbiota and their affiliation with physiochemical characteristics of different subsurface petroleum reservoirs // Int. Biodeterior. Biodegr. 2017. V. 120. P. 170–185.
- Liang R., Davidova I.A., Marks C.R., Stamps B.W., Harri-man B.H., Stevenson B.S., Duncan K.E., Suflita J.M. Metabolic capability of a predominant *Halanaerobium* sp. in hydraulically fractured gas wells and its implication in pipeline

corrosion // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. Article 988.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00988>

Lien T., Madsen M., Rainey F.A., Birkeland N.K. *Petrogoga mobilis* sp. nov., from a North Sea oil-production well // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998. V. 48. P. 1007–1013.

Liu Q.-Q., Li X.-L., Rooney A.P., Du Z.-J., Chen G.-J. *Tangfeifania diversioriginum* gen. nov., sp. nov., a representative of the family *Draconibacteriaceae* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014. V. 64. P. 3473–3477.

Magot M., Ollivier B., Patel B.K.C. Microbiology of petroleum reservoirs // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2000. V. 77. P. 103–116.  
<https://doi.org/10.1023/A:1002434330514>

Maniatis T., Fritsh E.F., Sambrook J., Engel J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.

Miranda-Tello E., Fardeau M.-L., Joulain C., Magot M., Thomas P., Tholozan J.-L., Ollivier B. *Petrogoga halophila* sp. nov., a thermophilic, moderately halophilic, fermentative bacterium isolated from an offshore oil well in Congo // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007. V. 57. P. 40–44.

Mormile M.R. Going from microbial ecology to genome data and back: studies on a haloalkaliphilic bacterium isolated from Soap Lake, Washington State // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5. Article 628.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00628>

Nesbø C.L., Bradnan D.M., Adebunsi A., Dlutek M., Petrus A.K., Foght J., Doolittle W.F., Noll K.M. *Mesotoga prima* gen. nov., sp. nov., the first described mesophilic species of the *Thermotogales* // *Extremophiles.* 2012. V. 16. P. 387–393.

Pfennig N., Lippert K.D. Über das vitamin B12 – bedürfnis phototropher schwefereibakterien // *Arch. Microbiol.* 1966. V. 55. P. 245–256.

Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41 (Database issue). P. D590–D596.

Ravot G., Magot M., Ollivier B., Patel B.K., Ageron E., Grimont P.A., Thomas P., Garcia J.L. *Haloanaerobium congolense* sp. nov., an anaerobic, moderately halophilic, thiosulfate- and sulfur-reducing bacterium from an African oil field // *FEMS Microbiol. Lett.* 1997. V. 147. P. 81–88.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10224.x>

Takahashi S., Tomita J., Nishioka K., Hisada T., Nishijima M. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of *Bacteria* and *Archaea* using next-generation sequencing // *PLoS One.* 2014. V. 9. Article e105592.

Zeikus J.G., Weimer P.J., Nelson D.R., Daniels L. Bacterial methanogenesis: acetate as a methane precursor in pure culture // *Arch. Microbiol.* 1975. V. 104. P. 129–134.

## Physiology and Genomic Characteristics of *Geotoga petraea*, a Bacterium Isolated from a Low-Temperature Petroleum Reservoir (Russia)

E. M. Semenova<sup>1</sup>, D. S. Grouzdev<sup>2</sup>, T. P. Tourova<sup>1</sup>, and T. N. Nazina<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>*Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

\*e-mail: nazina@inmi.ru

Received June 19, 2019; revised July 17, 2019; accepted July 29, 2019

**Abstract**—Members of the order *Thermotogales* often occur in high-temperature oilfields. They possess a toga, a characteristic external sheath. Members of the genus *Geotoga* have been as yet isolated only from oilfields and are represented by three strains with unsequenced genomes. The information on the intraspecific phenotypic diversity is scarce. An enrichment growing anaerobically on oil was obtained from formation water of the Vostochno-Anzirscoe oilfield (Russia). High-throughput sequencing of the V3–V4 region of the 16S rRNA genes revealed the enrichment to contain members of the genera *Tangfeifania* (51% of the total number of sequences), *Halanaerobium* (36%), *Arcobacter* (10%), and *Geotoga* (3%). Strain HO-Geo1 isolated from this enrichment belonged to the known species *Geotoga petraea* (99.2% similarity of the 16S rRNA gene sequences). The cells were motile rods surrounded by sheaths. They grew anaerobically, fermented carbohydrates and proteins producing acetate, H<sub>2</sub>, and CO<sub>2</sub>, and reduced thiosulfate and elemental sulfur to sulfide. In pure culture the strain did not grow on oil. Growth occurred within broad ranges of temperature (24–55°C, optimum at 47–50°C) and salinity (0.2–140 g/L, optimum at 20–40 g/L), which was in agreement with conditions of the low-temperature oilfield with highly mineralized formation water. The genome of strain HO-Geo1 (~2.15 Mb) contained 2057 genes, most of which were involved in protein, amino acid, and carbohydrate metabolism. High salt-tolerance of strain HO-Geo1 depended on the genes of adaptation to hyperosmotic stress. H<sub>2</sub> formation was determined by the presence of the genes encoding all four subunits of NADP-dependent dehydrogenase. In oilfields, members of the genus *Geotoga* probably utilize microbial biomass and the products of oil biodegradation formed by other microorganisms. They may be involved in corrosion of metal oil field equipment.

**Keywords:** oilfields, high-throughput sequencing, 16S rRNA gene, genome, *Geotoga petraea*