

ГЕНОМНЫЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГАЛОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ РОДОВ *HALOMONAS* И *MARINOBACTER* ИЗ НЕФТЯНЫХ ПЛАСТОВ¹

© 2022 г. Т. П. Турова^а, Д. Ш. Соколова^а, Е. М. Семенова^а,
А. П. Ершов^а, Д. С. Груздев^б, Т. Н. Назина^а, *

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

^бSciBear OU, Tallinn, 10115 Estonia

*e-mail: nazina@inmi.ru

Поступила в редакцию 25.01.2022 г.

После доработки 27.01.2022 г.

Принята к публикации 27.01.2022 г.

При эксплуатации нефтяных пластов с высокоминерализованными водами, отделенная от нефти вода закачивается обратно в пласты, что в ряде случаев приводит к увеличению солености среды и ограничивает возможность применения биотехнологий повышения нефтеизвлечения. Микробное сообщество таких пластов сравнительно мало изучено. Два штамма галофильных углеводородокисляющих бактерий *Halomonas titanicae* TAT1 и *Marinobacter lutaoensis* KAZ22 выделены из нефтяных пластов с минерализованной пластовой водой, определены их физиологические и геномные характеристики, детерминирующие их присутствие в этих местообитаниях, и возможность биотехнологического применения. Штаммы *H. titanicae* TAT1 и *M. lutaoensis* KAZ22 растут аэробно на сырой нефти в интервале температуры от 4 до 42 и от 22 до 55°C соответственно и имеют оптимумы роста при солености 2–12 и 5–10% NaCl (вес/об.). Феноменологические наблюдения деградации *n*-алканов нефти подтверждены обнаружением трех генов (*alkB1*, *alkB2* и *almA*), кодирующих алкан-1-монооксигеназы, в геноме штамма KAZ22, и одного гена *alkB* в геноме штамма TAT1. В геноме штамма *H. titanicae* TAT1 аннотированы все гены образования осмопротекторов бетаина, эктоина и гидроксиектоина, а у штамма *M. lutaoensis* KAZ22 – гены образования эктоина и гидроксиектоина. Рост штамма KAZ22 на нефти сопровождается снижением поверхностного натяжения среды более чем на 20 мН/м. Вследствие отсутствия гена нитритредуктазы *nirK* анаэробный рост штамма *H. titanicae* TAT1 в среде с ацетатом и нитратом приводит к накоплению около 100 мг нитрита/л, который может подавлять рост сульфидогенов. Биологические особенности штаммов и анализ геномов позволяют рекомендовать нагнетание нитрата и штамма *H. titanicae* TAT1 для биоаугментации нефтяных резервуаров с минерализованной пластовой водой для подавления коррозии и снижения содержания сульфида, а *M. lutaoensis* KAZ22 – для очистки от нефтяных загрязнений и увеличения нефтеотдачи пластов.

Ключевые слова: нефтяные пласты, галофилы, *Halomonas*, *Marinobacter*, геномы, гены *alkB* и *almA*, окисление *n*-алканов

DOI: 10.31857/S0026365622300036

Галофильные органотрофные гаммапротеобактерии родов *Halomonas* и *Marinobacter* часто встречаются в составе микробных сообществ местообитаний с высокой соленостью, включая морские водоемы, глубинные подземные горизонты, гидротермальные венты, нефтяные пласты, сточные воды нефтедобывающих предприятий, загрязненные нефтью почвы и поверхностные соленые озера (Huu et al., 1999; Mnif et al., 2009; Kaye et al., 2010; Al-Maillem et al., 2010; Fathepure, 2014; Luo et al.,

2015). Широкое распространение этих бактерий свидетельствует о потенциальном вкладе в биогеохимические циклы элементов в высокосолёных местообитаниях. Особый интерес представляют галофильные углеводородокисляющие бактерии, обитающие в нефтяных пластах. Пластовая вода многих нефтяных месторождений имеет высокую соленость, что осложняет нефтедобычу, очистку и утилизацию нефтезагрязненных вод. Применение микробных технологий на таких месторождениях ограничено вследствие негативного воздействия соли на микроорганизмы, включая разрушение клеточной стенки, денатурацию ферментов, а также низкой растворимости кислорода в этих

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365622300036 для авторизованных пользователей.

условиях (Fathpure, 2014). Положительное воздействие микроорганизмов на вытеснение нефти обусловлено жизнедеятельностью углеводородокисляющих бактерий, рост которых на нефти всегда сопровождается образованием поверхностно-активных веществ (Беляев и соавт., 2004). Некоторые углеводородокисляющие бактерии образуют не только био-ПАВ, но и экзополисахариды, что может быть использовано также в биотехнологиях повышения нефтеотдачи.

Из нефтяных пластов с высокоминерализованными водами были выделены галофильные и галотолерантные бактерии родов *Halomonas*, *Marinobacter*, *Bacillus* (Huu et al., 1999; Ben Ali Gam et al., 2007; Mnif et al., 2009; Fathpure, 2014; An et al., 2017) и археи *Haloferax*, *Halorubrum* (*Halobacterium*), *Halococcus* (Звягинцева и соавт., 1995), использующие углеводороды нефти. Бактерии росли в интервале температуры, pH и солености, характерных для нефтяного пласта; использовали широкий спектр углеводородов, жирных кислот, спиртов и сырую нефть. Сообщалось о выделении галотолерантных углеводородокисляющих бактерий родов *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* и *Pseudomonas* из нефти и пластовых вод месторождений Татарстана, Западной Сибири и Вьетнама (Борзенков и соавт., 2006).

Хотя бактерии родов *Halomonas* и *Marinobacter* имеют похожие физиологические характеристики и используют широкий круг субстратов и сырую нефть, в нефтяных пластах обычно преобладают бактерии одного из родов. Например, на высокотемпературном нефтяном месторождении Узень, заводняемом морской водой, бактерии рода *Marinobacter* были минорными компонентами микробных сообществ пластовой воды и становились доминирующей группой в посевах проб воды на среды с нитратом и органическими субстратами (Sokolova et al., 2021). В обработанном нитратом нефтяном пласте Северного моря наряду с доминирующими нитратредуцирующими бактериями рода *Terasakiella* присутствовали бактерии рода *Marinobacter*, способные расти на спиртах и жирных кислотах, восстанавливая нитраты (Bødtker et al., 2009). Галофильные/галотолерантные бактерии родов *Halomonas*, *Marinobacter*, *Halanaerobium*, *Modicisalibacter* и *Chromohalobacter* входили в состав культур денитрифицирующих бактерий, растущих при высокой солености среды (2.5 М NaCl), полученных из пластовой воды месторождения в Канаде (Vakken field, An et al., 2017). Внесение нитрата в хемостат с культурой сульфатредуцирующих бактерий из пластовой воды этого месторождения сопровождалось восстановлением нитрата до нитрита бактериями рода *Halomonas*, что приводило к подавлению роста сульфидогенов.

Из нефтяных месторождений в Тунисе выделен штамм *Halomonas* sp. C2SS100 и галофильная

бактерия *Modicisalibacter tunisiensis* LIT2^T семейства *Halomonadaceae*, которые росли в среде с нефтью в присутствии 0–14 и 1–25% NaCl (вес/об.) соответственно и имели оптимумы температуры при 37°C (Ben Ali Gam et al., 2007; Mnif et al., 2009). Из пластовой воды нефтяного месторождения во Вьетнаме выделена галотолерантная углеводородокисляющая бактерия *Marinobacter aquaeolei* (позднее отнесенная к виду *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* и затем к *Marinobacter nauticus*), которая росла в среде, содержащей от 0 до 20% NaCl (оптимум 5% NaCl) при температуре от 13 до 50°C (оптимум 30°C) (Huu et al., 1999).

Таким образом, бактерии родов *Halomonas* и *Marinobacter* в аэробных условиях могут расти на сырой нефти с образованием биоПАВ, а в анаэробных условиях расти гетеротрофно на органических субстратах, восстанавливая нитрат до нитрита или молекулярного азота. Какие биологические особенности позволяют им населять нефтяные пласты с минерализованными водами и разной температурой, и как эти бактерии могут быть использованы в биотехнологиях очистки от нефтяных загрязнений, увеличения нефтеотдачи или подавления коррозии, представляет научный и практический интерес.

В настоящее время известны четыре системы монооксигеназ, позволяющие микроорганизмам использовать *n*-алканы нефти: трансмембранные алкан-гидроксилазы (монооксигеназы), AlkB, флаavin-зависимые монооксигеназы, окисляющие длинноцепочечные алканы, AlmA и LadA, а также цитоплазматические цитохром P450-монооксигеназы. Некоторые бактерии, выделенные из нефтезагрязненных вод, в частности, *Amycollicoccus subflavus* DQS3-9A1^T, содержат в геноме все известные системы алкан-гидроксилаз (Nie et al., 2013).

Из пластовой воды Ромашкинского нефтяного месторождения (Россия) и из нефтяного месторождения Узень (Республика Казахстан) нами были выделены два штамма — *Halomonas titanicae* TAT1 и *Marinobacter lutaensis* KAZ22 соответственно.

Целью настоящего исследования было изучение физиологии и геномных детерминант деградации *n*-алканов и устойчивости к повышенной солености у галофильных бактерий родов *Halomonas* и *Marinobacter*, выделенных из нефтяных пластов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы. В работе использовали бактериальные штаммы *Halomonas titanicae* TAT1 (VKM В-3500D) и *Marinobacter lutaensis* KAZ22 (VKM В-3501D), выделенные ранее из проб пластовой воды залежи 302 Ромашкинского нефтяного месторождения (Республика Татарстан, Россия)

и нефтяного месторождения Узень (Республика Казахстан) соответственно (Grouzdev et al., 2020). Характеристика проб пластовой воды, используемой для выделения штаммов, приведена в табл. S1 (дополнительные материалы). Нефтяные пласты залежи 302 располагаются на глубине 493–515 м ниже уровня моря, имеют температуру 17–23°C. Пластовая вода имеет общую соленость от 17.0 до 23.4 г/л. Вода содержит сульфаты и сульфид (от 150 до 290 мг/л); pH варьирует от 6.8 до 7.9 (Nazina et al., 2013). Для поддержания пластового давления в залежь нагнетают пресную речную воду, смешанную с пластовой водой. Нефтяные пласты месторождения Узень залегают на глубине 1080–1370 м, имеют температуру около 57–68°C, заводняются сточной нефтепромысловой водой, смешанной с водой Каспийского моря. Штамм KAZ22 выделен из пробы воды, изливающейся из призабойной зоны нагнетательной скважины 2755, где температура пласта снижалась до 40–45°C; пластовая вода отнеслась к хлоркальциевому типу, ее минерализация составляла 51.4 г/л, pH 6.6 (Sokolova et al., 2021).

Состав сред и условия культивирования бактерий. Бактерии культивировали на минеральной среде, содержащей (г/л): K_2HPO_4 – 1.5; KH_2PO_4 – 0.75; NH_4Cl – 1.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.1; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0.02; KCl – 0.1; дрожжевой экстракт – 0.5; $NaCl$ – 100.0; раствор микроэлементов; pH 6.8–7.2. В качестве источника углерода и энергии в среду вносили сырую тяжелую нефть (1%, об./об.) плотностью 0.932 г/см³, содержащую 23.5% насыщенных углеводородов, 42.3% ароматических углеводородов, 30.1% смол и 4.1% асфальтенов. Бактерии культивировали на качалке (110 об./мин) при температуре 28°C, если не указано иное. Спектр используемых субстратов определяли в минеральной среде того же состава; сахара, пептон, триптон и дрожжевой экстракт добавляли 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 без субстрата. Анаэробный рост исследовали, используя среду с ацетатом в качестве источника углерода и энергии, и нитратом натрия (0.85 г/л) в качестве акцептора электронов. Оптимум солености и диапазоны роста определяли на указанной выше среде, содержащей от 0 до 20% $NaCl$ (вес/об.). Интервал температуры для роста определяли в среде, оптимальной по солености, после 7 сут инкубации. Рост оценивали по изменению величины оптической плотности среды (OD_{660}) и микроскопированием посевов. С использованием наборов API 50CH и API ZYM (“Biomeérieux”, Франция) анализировали спектр используемых субстратов и ферментативную активность штаммов.

Определение использования *n*-алканов нефти. Биodeградацию нефти оценивали после инкуба-

ции штаммов в указанной выше минеральной среде, содержащей 0.5 г/л нефти и 0.05 г/л дрожжевого экстракта, после 7 сут инкубации при 37°C. Изменение содержания *n*-алканов в деградированной нефти определяли газохроматографическим методом по сравнению с контролем (в %), как описано ранее (Борзенков и соавт., 2006).

Методы молекулярной идентификации штаммов и детекции генов алкан-монооксигеназ. ДНК выделяли из биомассы штаммов с использованием набора реактивов “DIAtom™ DNA Prep100” (“Биокон”, Россия) согласно рекомендациям фирмы изготовителя. Очищенный препарат ДНК использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР. Чистые культуры идентифицировали методом анализа гена 16S рРНК с использованием универсальных праймеров (Lane, 1991). Гены алкан-монооксигеназ (*alkB*, *ladAα*, *ladAβ*, *ladB*, *sup153A*) амплифицировали с использованием праймеров, приведенных в табл. S2 (дополнительные материалы). Секвенирование ДНК проводили по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе ABI 3730 DNA Analyzer, с использованием набора реактивов ABI PRISM BigDye™ Terminator v 3.1 (“Applied Biosystems”, США). При детекции генов алкангидроксилаз использовали штаммы из коллекции лаборатории нефтяной микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН, а также штамм *Geobacillus icigianus* G1w1^T (=VKM B-2853^T = DSM 28325^T), предоставленный сотрудниками Института цитологии и генетики СО РАН (Bryanskaya et al., 2015).

Секвенирование и анализ геномов. Штамм KAZ22 выращивали аэробно в среде LB с 5% (вес/об.) $NaCl$ при температуре 40°C, клетки собирали центрифугированием через 7 сут культивирования. ДНК очищали от клеточной биомассы с помощью цетилтриметиламмоний бромидом (Wilson, 2001). Библиотеки ДНК были подготовлены с помощью набора реагентов (NEBNext DNA library prep для Illumina, “New England Biolabs”). Секвенирование геномной ДНК проводили на HiSeq 2500 (“Illumina Inc.”, США) в формате парно-концевых прочтений 2 × × 150 п.н. Качество последовательностей проверяли с помощью FastQC v. 11.7 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Последовательности были обрезаны с помощью Trimmomatic v. 0.36 (Bolger et al., 2014). Отфильтрованные по качеству риды были *de novo* собраны с помощью SPAdes v. 3.13.0 с использованием настроек по умолчанию (Bankevich et al., 2012). Полноту и контаминацию геномов оценивали с использованием программы CheckM v1.0.18 (Parks et al., 2015). Собранные геномы анализировали с помощью GTDB-Tk 1.0.2 для определения филогенетически близких таксонов (Chaumeil et al., 2019). Среднюю нуклеотидную идентичность (ANI) оценивали с помощью

FastANI v. 1.3 (Jain et al., 2018). Цифровую ДНК–ДНК-гибридизацию (dDDH) геномов проводили с использованием Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) v. 2.1 (Meier-Kolthoff et al., 2013). Идентификацию белок-кодирующих последовательностей и первичную аннотацию геномов проводили с помощью NCBI Prokaryotic Genome Automatic Annotation Pipeline (PGAP) (Tatusova et al., 2013).

Геном штамма TAT1 был секвенирован и расшифрован ранее, как описано в статье (Grouzdev et al., 2020).

Биоинформатический анализ. Реконструкцию возможных путей метаболизма алканов и осмопротекторов проводили на основании сравнения геномов исследуемых штаммов с использованием онлайн-сервисов NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>), PATRIC (<https://www.patricbrc.org>) и KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Сравнение кластеров генов деградации алканов и синтеза осмопротекторов проводили с использованием онлайн-сервиса Gene Graphics (<https://katlabs.cc/genegraphics/app>).

Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК штаммов *H. titanicae* TAT1 и *M. luteoensis* KAZ22 были помещены в GenBank под номерами MK478935 и MT277027, геномы депонированы в DDBJ/EMBL/GenBank под номерами JABWTV010000000 и JABWTC000000000 соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физиологические характеристики выделенных галотолерантных бактерий и деградация нефти. Выделенные штаммы TAT1 и KAZ22 были идентифицированы на основании BLAST-анализа генов 16S рРНК с использованием базы данных GenBank. В результате анализа был обнаружен 100% уровень идентичности гена 16S рРНК штамма TAT1 с соответствующим геном типового штамма *Halomonas titanicae* ВН1^T (AC NR_117300), а штамма KAZ22 – с типовым штаммом *Marinobacter luteoensis* T5054^T (AC NR_025116), на основании чего новые штаммы были отнесены к соответствующим видам. Штаммы *Halomonas titanicae* TAT1 и *Marinobacter luteoensis* KAZ22 были представлены подвижными палочками, окрашивающимися по Граму отрицательно (табл. 1, рис. S1, дополнительные материалы). Фенотипически штаммы проявляли похожие свойства. В аэробных условиях использовали сахара, органические кислоты, аминокислоты, *n*-алканы нефти. Штамм *H. titanicae* TAT1 был способен также расти в анаэробных условиях в среде с ацетатом, восстанавливая нитрат с образованием около 100 мг нитрита/л. Штаммы *H. titanicae* TAT1 и *M. luteoensis* KAZ22 имеют оптимумы роста при солености 2.0–12 и

5–10% NaCl (вес/об.) соответственно (табл. 1). Эти значения совпадают с оптимумами солености (0.5–2.5 М) группы умеренных галофилов, согласно классификации (Edbeib et al., 2016). Способность штамма TAT1 расти в отсутствие соли в среде позволяет отнести его к группе галотолерантных бактерий, тогда как штамм KAZ22 является галофилом. Штамм *H. titanicae* TAT1 проявлял психротолерантные свойства и рос при температуре от 4 до 42°C, а штамм *M. luteoensis* KAZ22 был термотолерантным и рос при более высокой температуре (22–55°C). Интервалы температуры и солености для роста штаммов TAT1 и KAZ22 соответствовали условиям их местообитания в нефтяных пластах. Штамм *H. titanicae* TAT1 проявлял слабый рост на нефти, используя длинноцепочечные C₂₀–C₂₃ и C₂₆–C₃₂ *n*-алканы (рис. S2a). Штамм *M. luteoensis* KAZ22 использовал C₁₄–C₁₉ *n*-алканы нефти (рис. S2b). Штамм TAT1 рос на тяжелой нефти, снижая поверхностное натяжение и межфазное натяжение среды (против гексадекана) более чем на 10 мН/м по сравнению со стерильной средой. Штамм KAZ22 проявлял реологические свойства как при росте на нефти, так и на растворимых субстратах; он снижал поверхностное натяжение более чем на 20 мН/м и межфазное (против гексадекана) – на 10 мН/м, вызывая эмульгирование среды (индекс эмульгирования E₂₄ составлял 20%). Время удвоения μ штамма KAZ22 составляло 0.58 сут⁻¹ в среде с бакто-триптоном (5.0 г/л), дрожжевым экстрактом (2.5 г/л), глюкозой (1.0 г/л) и 60 г NaCl/л при 37°C. Способность расти в широком интервале температуры, вероятно, обуславливает присутствие штамма KAZ22 в призабойной зоне нагнетательной скважины высокотемпературного нефтяного месторождения Узень. Нагнетание сточной нефтепромысловой воды, смешанной с водой Каспийского моря, приводит к локальному снижению температуры пласта с 57–68°C до 40–45°C (Sokolova et al., 2021). Таким образом, температурный режим и общая минерализация пластовой воды (51.4 г/л) в зоне нагнетательной скважины 2755 были благоприятными для роста штамма KAZ22. Поступление кислорода, растворенного в закачиваемой воде, поддерживает рост популяции аэробных нефтеокисляющих бактерий в зоне нагнетания.

Детекция генов окисления *n*-алканов. С использованием тотальной ДНК и вырожденных праймеров, приведенных в табл. S1, был выполнен поиск генов деградации алканов (*alkB*, *ladA α* , *ladA β* , *ladB*, *cyp153A* и *almA*) у галофильных бактерий *H. titanicae* TAT1 и *M. luteoensis* KAZ22. Ожидаемая длина ПЦР-продуктов генов *alkB* – 500 п.н., *ladA α* и *ladA β* – около 1500 п.н., *ladB* – около 1000 п.н., *cyp153* – 800 п.н. и *almA* – около 1100 п.н. В качестве положительного контроля использовали штамм *Geobacillus icigianus* G1w1^T, у которого ранее были

Таблица 1. Фенотипические признаки галофильных/галотолерантных бактерий *M. lutaensis* KAZ22 и *H. titanicae* TAT1, выделенных из нефтяных пластов

Признак	TAT1	KAZ22
Морфология клеток	Палочки	Палочки
Размер клеток (мкм)	0.6 × 2.0	2.0–3.5 × 0.6–1.0
Подвижность	+	+
Интервал (оптимум) NaCl для роста, % (вес/об.)	0–20 (5–10)	0.5–14 (2.0–12)
Интервал (оптимум) температуры для роста, °C	4–42 (37)	22–55 (28–37)
Образуют кислоту из:		
мальтоза	+	+
манноза	–	+
маннит, сахароза	+	–
Используют:		
<i>n</i> -алканы нефти	+	+
ацетат	+/-	+
формиат, бутират, бензоат	–	–
валерат	–	+/-
цитрат	+	–
пируват, сукцинат, fumarат, глутамат	+	+
DL-фенилаланин	+	–
нафталин		+
NO ₃ ⁻ → NO ₂ ⁻	+	–
NO ₃ ⁻ → N ₂	–	–
Образование H ₂ S	–	–
Уреаза	+	–
Активность ферментов (API Zym):		
щелочная фосфатаза, эстераза (C4), лейцин ариламидаза, валин ариламидаза, цистин ариламидаза, нафтол-AS-VI-фосфогидролаза β-глюкозидаза	+	+
α-химитрипсин, β-галактозидаза, β-глюкуронидаза, α-фукозидаза	–	–
эстераза липаза (C8), липаза (C14), N-ацетил-β-глюкозаминидаза, α-маннозидаза	–	+
трипсин, кислая фосфатаза, α-глюкозидаза	+	–
Г + Ц генома, %	54.6	63.4
Филогенетически близкий вид	<i>Halomonas titanicae</i> BH ^T	<i>Marinobacter lutaensis</i> T5054 ^T
Сходство генов 16S рРНК, %	99.73	99.9%

обнаружены гены *alkB*, *ladAα*, *ladAβ* и *ladB* (Tougo et al., 2018).

В результате ПЦР с использованием праймеров, специфичных гену *alkB*, ПЦР-продукт ожи-

даемой длины (около 500 п.н.) был получен для *M. lutaensis* KAZ22, *H. titanicae* TAT1 и *G. icigianus* G1w1^T (рис. S3a). С использованием праймеров к гену *ladA*, кодирующему алкан-монооксигеназу,

Таблица 2. Характеристика геномов бактерий *H. titanicae* TAT1 и *M. lutaoensis* KAZ22

Характеристика	<i>H. titanicae</i> TAT1	<i>M. lutaoensis</i> KAZ22
Биопроект	PRJNA637646	PRJNA638879
Номер в Генбанке	JABWTB010000000	JABWTC000000000
Размер генома (п.н.)	5303463	3460169
G + Ц генома, %	54.6	63.4
Полнота сборки/контаминация, %	100.0/0.9	99.56/0.29
Количество парноконцевых ридов	8878727	5406706
N ₅₀ (п.о.)	381158	111938
Покрытие (×)	285	460
Общее количество генов	4908	3231
Количество белок-кодирующих генов	4743	3066
Количество генов (РНК)	67	60
Ближайший родственный вид (номер геномной сборки)	<i>H. titanicae</i> BH1 ^T (GCF_000336575)	<i>M. lutaoensis</i> T5054 ^T (GCF_001981305)
ANI/dDDH	99.8%/99.2%	99.3%/94.7%

участвующую в деструкции длинноцепочечных алканов (гены *ladAα*, *ladAβ*, *ladB*), специфичный ПЦР-продукт был получен только для контрольного штамма *G. icigianus* G1w1^T (рис. S3б–S3г). У других исследуемых штаммов бактерий продукт не был детектирован. С праймерами к гену цитохром-подобной монооксигеназы (*cyp153*) специфичная амплификация наблюдалась только с ДНК *R. erythropolis* HO-KS22 (рис. S3д). Специфичный ПЦР-продукт гена *almA* (около 1100 п.н.) получен для всех исследованных штаммов маринобактеров (рис. S3е).

Характеристика геномов *Halomonas titanicae* TAT1 и *Marinobacter lutaoensis* KAZ22. Геном *H. titanicae* TAT1 состоял из 51 скаффолда общим размером 5303463 п.н., имел среднее покрытие 285× и G + C содержание 54.6% (табл. 2). Значения ANI и dDDH с близкородственным геномом *H. titanicae* BH1^T составили 99.8 и 99.2% соответственно, что подтверждает идентификацию штамма как представителя этого вида (Grouzdev et al., 2020). Геном содержал 4910 генов, из которых 4757 были белок-кодирующими генами и 67 кодирующими РНК. Функциональная аннотация генома, выполненная с использованием RASTk, выявила 409 генов связанных с метаболизмом аминокислот и их производных, 273 гена связанных с углеводным обменом, 212 генов – с метаболизмом кофакторов, витаминов, пигментов и 169 генов ассоциированных с белковым обменом. Анализ генома, основанный на результатах функционального предсказания белков с помощью BlastKOALA, позволяет предположить, что геном штамма TAT1 содержит все ключевые гены, отвечающие за полные пути углеводного обмена: гли-

колиз (путь Эмбдена–Мейергофа), окисление пирувата, цитратный цикл (ЦТК), пентозофосфатный путь, путь Энтнера–Дудорова, деградация D-глюкуроната и D-галактоната, гликозилатный цикл. Кроме того, геном содержит гены деградации бензоата (*benABCDE*) и катехола (*catABC*), организованные в единый генный кластер. Геном TAT1 несет гены *cysND*, *cysC*, *cysH*, *cysI*, ответственные за ассимиляционную сульфатредукцию.

В результате секвенирования и сборки генома штамма KAZ22 было получено 70 скаффолдов общим размером 3460169 п.н. и содержанием G + C 63.4%. Значения ANI и dDDH для KAZ22 и ближайшего штамма *M. lutaoensis* T5054^T составили 99.3 и 94.7% соответственно, что указывает на принадлежность изолированного штамма к этому виду. Геном штамма *M. lutaoensis* KAZ22 содержал 3236 генов, из них 3059 белок-кодирующих последовательностей, 117 псевдогенов и 60 генов РНК. Анализ с помощью RASTk показал, что 183 гена связаны с углеводным обменом, 308 генов – с метаболизмом аминокислот и их производных, 189 генов – с метаболизмом белков, 127 генов – с метаболизмом кофакторов, витаминов и пигментов. Геном штамма KAZ22 несет полные наборы генов для гликолиза, окисления пирувата, цикла трикарбоновых кислот, пентозофосфатного пути, пути Энтнера–Дудорова, биосинтеза гликогена. Геном также имеет гены, необходимые для ассимиляционной сульфатредукции, а также сульфид:хиноноксидоредуктазу.

Филогенетический анализ и структура генов окисления алканов. Экспериментальные данные по ПЦР-детекции генов алкан-монооксигеназ, которые продемонстрировали амплификацию генов *alkB*

и *almA* на матрице ДНК штамма *M. lutaoensis* KAZ22 и гена *alkB* на матрице ДНК штамма *H. titanicae* TAT1, были подтверждены на основании анализа их геномов.

В геноме штамма *M. lutaoensis* KAZ22 было аннотировано 2 гена алкан-1-монооксигеназ (*alkB1* и *alkB2*) длиной 1284 и 1140 п.н. соответственно. В базе данных GenBank транслированные аминокислотные последовательности этих генов (427 и 379 а.о.) были близки к аналогичным последовательностям разных видов и неидентифицированных штаммов рода *Marinobacter*. На филогенетическом дереве (рис. 1) эти последовательности составляли отдельные близкородственные кластеры в составе гаммапротеобактерий. Кластер видов, содержащих *alkB1* ген, включал также штаммы *Marinobacter* sp. UBA856 и *Marinobacter* sp. UBA7807 (100% идентичности генов *alkB1*), типовой штамм *M. lutaoensis* T5054^T (97% идентичности с единственным геном *alkB*), а также *M. salsuginis* NBRC 109114 (87% идентичности генов *alkB1*). В кластер, к которому относился *alkB2* ген штамма KAZ22, также входили *alkB* гены штаммов *Marinobacter* sp. UBA856 и *Marinobacter* sp. UBA7807 (100% идентичности) и *M. salsuginis* NBRC 109114 (83% идентичности) с высоким уровнем бутстреп-поддержки (100%). Однако в геноме типового штамма *M. lutaoensis* T5054^T ген *alkB2* отсутствовал.

В результате аннотирования генома штамма *H. titanicae* TAT1 был выявлен единственный ген алкан-1-монооксигеназы (*alkB*) длиной 1224 п.н., хотя в геноме типового штамма *H. titanicae* ВН1^T этот ген отсутствует. В базе данных GenBank транслированная аминокислотная последовательность *alkB* гена *H. titanicae* TAT1 (407 а.о.) была наиболее близка к аналогичным последовательностям из геномов гамма-протеобактерий родов *Halomonas* и *Marinobacter*. На филогенетическом дереве транслированных аминокислотных последовательностей генов *alkB* (рис. 1) последовательность штамма TAT1 относилась к близкородственному кластеру, включающему гомологичные последовательности *Halomonas* sp. MG34, *Halomonas* sp. JS92-SW72 и *H. daqingensis* CGMCC 1.6443 (96–100% идентичности), а также *M. hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840 (*alkB2*) (96% идентичности) и *M. salsuginis* NBRC 109114 (*alkB3*) (83% идентичности), с бутстреп-поддержкой 99%, что свидетельствует о достоверности ветвления.

Таким образом, *alkB*-гены штаммов *H. titanicae* TAT1 и *M. lutaoensis* KAZ22 распределились на филогенетическом дереве по трем кластерам, которые были обозначены как “*Marinobacter*-AlkB1, AlkB2 и AlkB3” в соответствии с тройным набором *alkB*-генов в геноме штамма *M. salsuginis* NBRC 109114.

Кроме генов алкан-1-монооксигеназ, в геноме штамма *M. lutaoensis* KAZ22 был также аннотирован ген *almA* длиной 1527 п.н., кодирующий флавин-зависимую монооксигеназу (AlmA). В базе данных GenBank транслированная аминокислотная последовательность *almA* гена (508 а.о.) была наиболее близка к аналогичным последовательностям из геномов гамма-протеобактерий рода *Marinobacter*. На построенном филогенетическом дереве (рис. 2) *almA* ген штамма KAZ22 входил в близкородственный кластер генов разных видов рода *Marinobacter* с высоким уровнем бутстреп-поддержки (100%). При этом наиболее близкими к нему также оказались гены штаммов *Marinobacter* sp. UBA856, *Marinobacter* sp. UBA7807 и типового штамма *M. lutaoensis* T5054^T (100% идентичности).

Гены алкан-монооксигеназ присутствуют в большинстве геномов бактерий рода *Marinobacter* (*alkB* гены в 90% и *almA* гены в 86% из 362 геномов), при этом многие из них содержат больше одного гена на геном. Это свидетельствует о том, что способность к использованию *n*-алканов является важной частью метаболизма представителей этого рода. При этом некоторые штаммы сохранили полный набор генов алкан-монооксигеназ (*alkB*, *alkB2*, *alkB3* и *almA*), аналогично штамму *M. salsuginis* NBRC 109114, а другие утрачивали гены из полного набора, что, возможно, было связано с особенностями их сред обитания. Штамм *M. lutaoensis* KAZ22, как и многие бактерии рода *Marinobacter*, входящие в “*Marinobacter*-AlkB1 и -AlkB2” филогенетические кластеры, характеризуется присутствием нескольких *alkB*-генов, расположенных в разных областях генома и не связанных с другими генами деградации *n*-алканов. Генная организация AlkB1-области была идентична для штаммов KAZ22, *Marinobacter* sp. UBA856, *Marinobacter* sp. UBA7807 и *M. lutaoensis* T5054^T. Для этих штаммов *alkB1*-ген фланкирован противоположно направленными генами, детерминирующими неизвестный белок и 3-метилмеркаптопропионил-КоА дегидрогеназу (рис. 3а). Похожая организация AlkB1-области выявлена для *M. salsuginis* NBRC 109114 и других штаммов *Marinobacter*-AlkB1 кластера.

Генная организация AlkB2-области также идентична для штамма KAZ22 и штаммов *Marinobacter* sp. UBA856, *Marinobacter* sp. UBA7807 и *M. salsuginis* NBRC 109114. В этой области *alkB2*-ген фланкирован геном лактоилглутатионлиазы (*gloA*) и противоположно направленным геном транскрипционного регулятора семейства GntR (рис. 3б). Такая структура генной области AlkB2 характерна для многих представителей рода *Marinobacter*, обладающих гомологичным *alkB*-геном. Можно отметить, что в геноме типового штамма *M. lutaoensis* T5054^T имеются аналогично направленные гены лактоилглутатионлиазы и

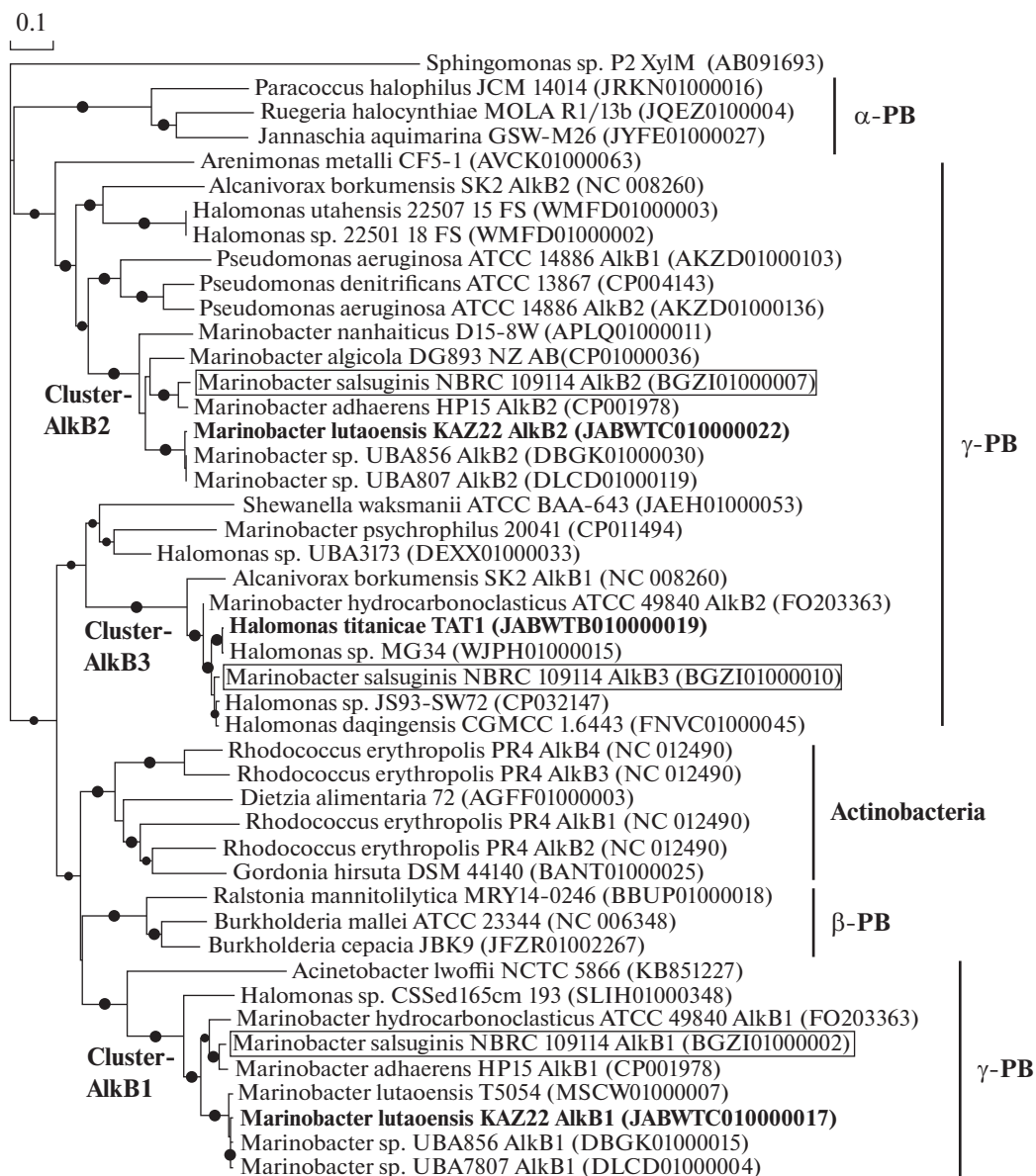


Рис. 1. Филогенетическое дерево транслированных аминокислотных последовательностей генов *alkB* различных филюмов бактерий, включая бактерии родов *Marinobacter* и *Halomonas*. Дерево построено с использованием алгоритма maximum likelihood. Жирным шрифтом выделены последовательности, исследованные в данной работе, рамкой — штамм *M. salsuginis* NBRC 109114, в геноме которого представлено 3 *alkB*-гена. Точками обозначены ветви дерева с бутстреп-поддержкой больше 80%. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 10 заменам на каждые 100 аминокислотных остатков.

транскрипционного регулятора семейства *GntR*, хотя ген *alkB2* между ними отсутствует, что, видимо, связано с его потерей в процессе эволюции.

Генная организация *AlmA*-области штамма KAZ22 была похожа на таковую штамма *M. lutaoensis* T5054^T, а также неидентифицированного штамма *Oceanospirillales bacterium* SP333. Ген *AlmA* был расположен одиночно и фланкирован геном неизвестного белка и противоположно направленным геном, предположительно сходным с транслютаминазой (рис. 3в). Остальные бактерии рода

Marinobacter, включая *M. salsuginis* NBRC 109114, входящие в родственный кластер на филогенетическом дереве, имели другую структуру *AlmA*-области генома.

Исходя из сходства последовательностей генов деградации *n*-алканов штамма *M. lutaoensis* KAZ22, а также сходства структуры областей расположения этих генов в геномах, можно предположить эволюционную взаимосвязь его способности к деградации *n*-алканов с таковой других бактерий рода *Marinobacter*, из которых самым близким к

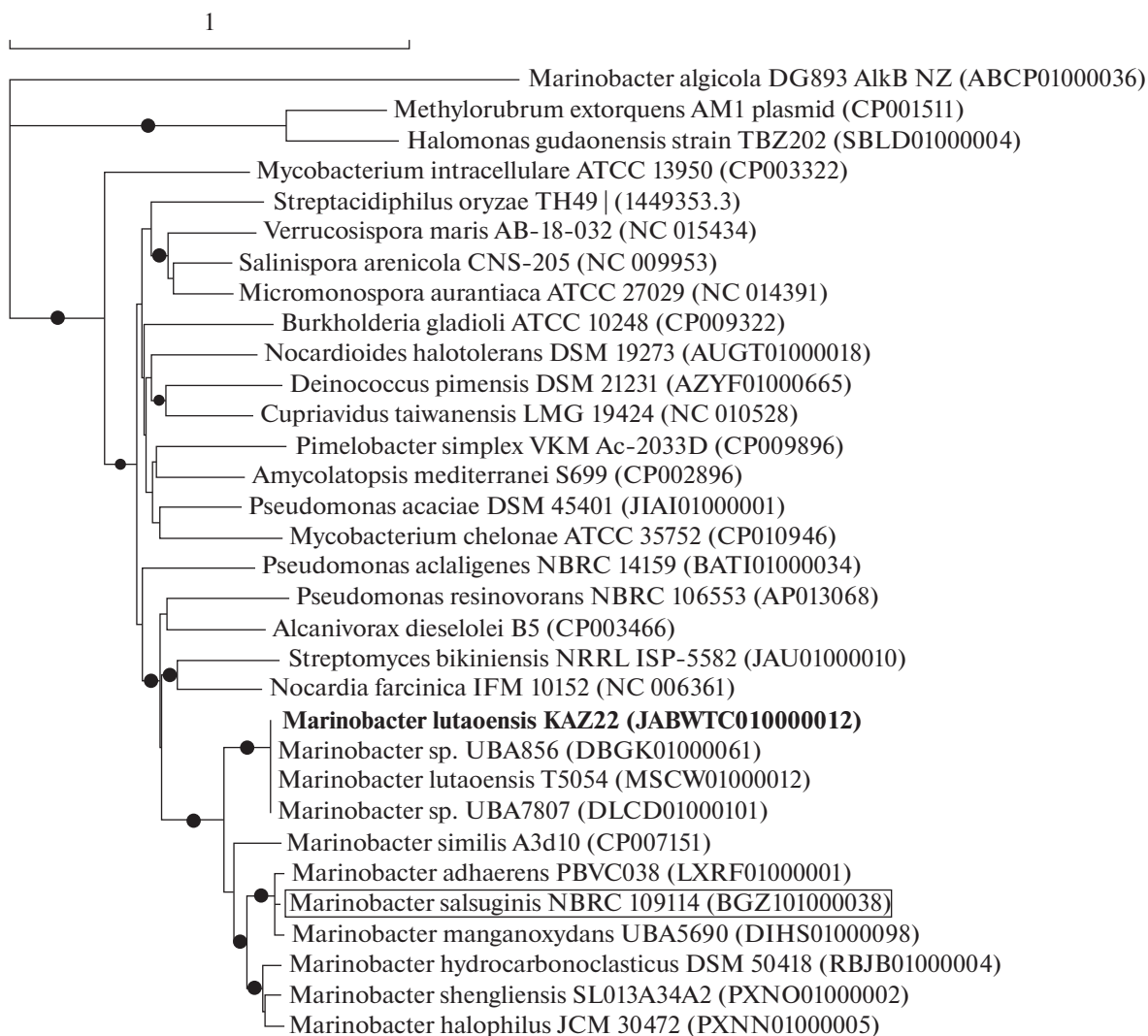


Рис. 2. Филогенетическое дерево транслированных аминокислотных последовательностей генов *almA* различных филюмов бактерий, включая бактерии рода *Marinobacter*. Дерево построено с использованием алгоритма maximum likelihood. Жирным шрифтом выделена последовательность, исследованная в данной работе. Точками обозначены ветви дерева с бутстреп-поддержкой больше 80%. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 10 заменам на каждые 100 аминокислотных остатков.

нему является типовой штамм вида *M. lutaensis* T5054^T.

Из 464 проанализированных геномов бактерий рода *Halomonas* всего в 5% геномов были аннотированы гены алкан-1-моноксигеназ (*alkB*), причем в каждом из этих геномов, как и в геноме штамма *H. titanicae* TAT1, был представлен единственный *alkB* ген. При этом структура *AlkB*-областей в геномах отдельных бактерий рода *Halomonas* была различной (рис. 3г). В области расположения гена *alkB* в геноме штамма *H. titanicae* TAT1 присутствовали и другие гены, участвующие в деградации *n*-алканов: ген рубредоксина, ген альдегидгидрогеназы *alkH*, ген алкогольдегидрогеназы *alkJ*, а также противоположно направленный ген активатора транскрипции *alkB*

генного кластера. Аналогичной генной структурой в этой области обладают геномы бактерий рода *Halomonas* (*Halomonas* sp. MG34 и *H. daqingensis* CGMCC 1.6443), нескольких штаммов рода *Marinobacter*, относящихся к филогенетическому кластеру “*Marinobacter-AlkB3*”, включая *M. salsuginis* NBRC 109114 (*alkB3*) и *M. hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840, а также представителей других родов *Gamma*- и *Alphaproteobacteria* (*Alcanivorax*, *Sulfitobacter*, *Hyphomonas*, *Bradyrhizobium*).

Сходство структуры достаточно протяженного участка генома позволяет предположить возможность появления детерминант деградации *n*-алканов и приобретения соответствующих процессов метаболизма у штамма *H. titanicae* TAT1 и близких к нему штаммов за счет межвидового горизон-

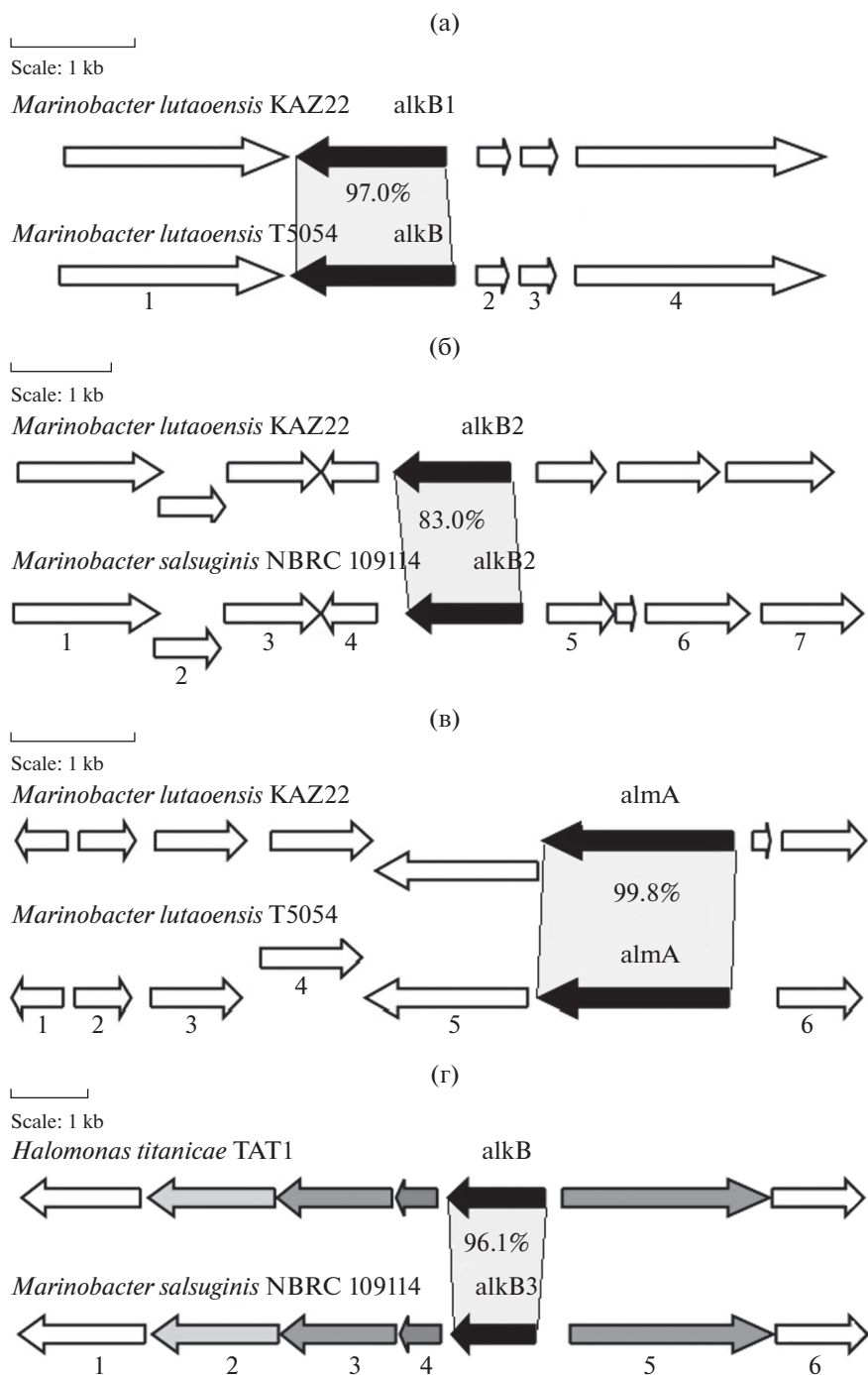


Рис. 3. Сравнение структуры геномных кластеров, содержащих аннотированные гены алкан-монооксигеназ у штаммов галофильных бактерий. Обозначения: (а) – 1 – 3-метилмеркаптопропионил-КоА дегидрогеназа (DmdC), 2, 3 – неизвестный белок, 4 – предполагаемая фосфатаза; (б) – 1 – предполагаемая L-лактатдегидрогеназа, 2 – субъединица YkgG неизвестного белка, 3 – пермеаза, 4 – лактоилглутатион лиаза (GloA), 5 – транскрипционный регулятор семейства GntR; (в) – 1 – FAD/FMN-зависимая оксидоредуктаза, 2 – регулятор транскрипции, 3 – белок внешней мембраны, 4 – тиоредоксин, 5 – неизвестный белок, 6 – предположительно транслютаминаза; (г) – 1 – 3-метилмеркаптопропионил-КоА лигаза, 2 – алкогольдегидрогеназа (AlkJ), 3 – альдегиддегидрогеназа (AlkH), 4 – рубредоксин (Rub), 5 – активатор транскрипции alkB-кластера, 6 – ферредоксин-редуктаза.

тального переноса генов, вероятно, из геномов бактерий рода *Marinobacter*, для которых эта способность является характерной. Вероятно, такой

перенос обусловлен приспособлением штамма *H. titanicae* TAT1 к существованию в загрязненных нефтью водных средах, что существенно отличает

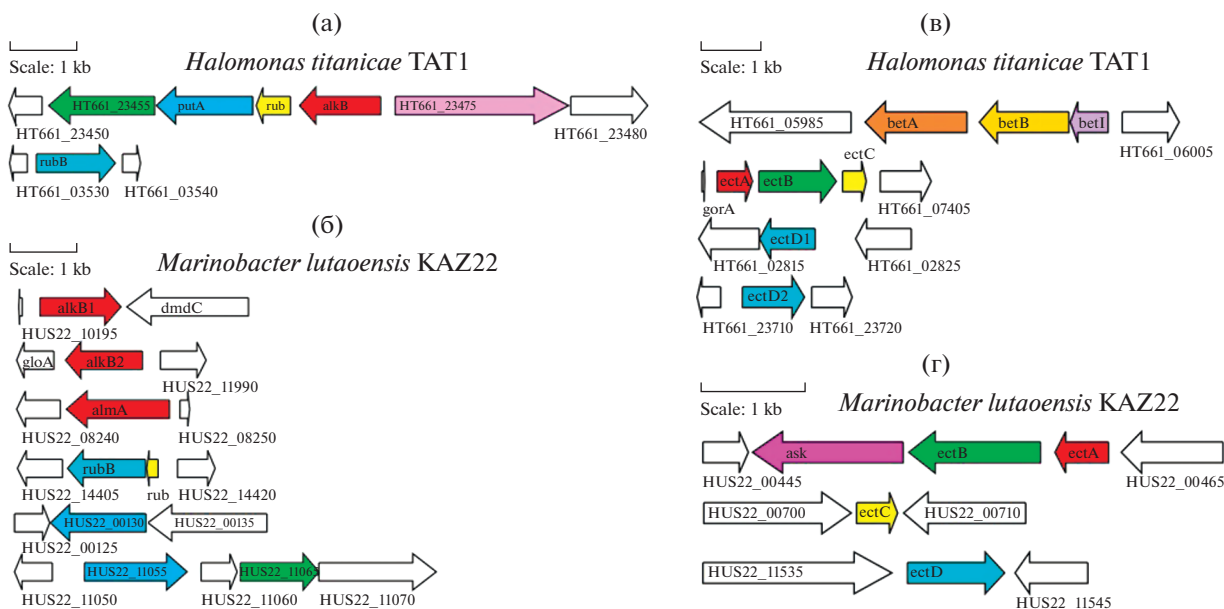


Рис. 4. Комплексы генов деградации *n*-алканов (а, б) и генов синтеза осмопротекторов (в, г) в геномах бактерий *H. titanicae* TAT1 (а, в) и *M. lutaensis* KAZ22 (б, г). Обозначения генов: (а) – HT661-23455 – алкогольдегидрогеназа; HT661_23480 – альдегиддегидрогеназа; rub – рубредоксин; alkB – алкан-1-монооксигеназа; HT661_23475 – активатор транскрипции alkB-кластера; rubB – рубредоксинредуктаза; (б) – alkB1, alkB2, almA – алкан-1-монооксигеназа; rub – рубредоксин; rubB – рубредоксинредуктаза; HUS22_00130, HUS22_11055 – альдегиддегидрогеназа; HUS22_11065 – алкогольдегидрогеназа; (в) – betA – холиндегидрогеназа; betB – бетаин-альдегиддегидрогеназа; ectA – диаминобутиратацетилтрансфераза; ectB – диаминобутираттрансфераза; ectC – эктоинсинтаза; ectD1, ectD2 – эктоингидролаза; (г) – ectA – диаминобутиратацетилтрансфераза; ectB – диаминобутираттрансфераза; ectC – эктоинсинтаза; ask – аспартакиназа.

его от типового штамма *H. titanicae* BH1^T (Sanchez-Rogro et al., 2010) и других штаммов, идентифицированных как *H. titanicae*, которые выделены из морских сред и не имеют в геномах *alkB* генов.

Гены метаболизма *n*-алканов. Согласно базе данных KEGG, процесс деградации алканов включен в путь метаболизма “Деградация жирных кислот” (рис. S4а, S4б). Фермент алкан-монооксигеназа (EC 1.14.15.3) участвует в этом процессе как на начальной стадии окисления алканов, так и на терминальной стадии окисления ω-гидроксизирных кислот. Исходя из аннотации геномов *M. lutaensis* KAZ22 и *H. titanicae* TAT1 потенциальное присутствие этого фермента предполагается для обоих штаммов, при этом для *M. lutaensis* KAZ22 показано присутствие двух форм фермента, как негемовой железо-содержащей формы (AlkB), так и флавин-зависимой формы (AlmA), а для *H. titanicae* TAT1 только формы AlkB (рис. S4а, S4б). Вместе с алкан-монооксигеназой в состав гидролазной системы окисления алканов входят белок рубредоксин и фермент рубредоксинредуктаза (EC 1.18.1.1), гены которых также представлены в геномах обоих штаммов. Однако локализация этих генов в геномах исследуемых штаммов различается. У *H. titanicae* TAT1 ген рубредоксина (*rub*) входит в один кластер с единственным геном *alkB*, а ген рубредоксинредуктазы (*rubB*) расположен на дру-

гом участке генома (рис. 4а, 4б). У *M. lutaensis* KAZ22 оба этих гена составляют кластер, расположенный отдельно от каждого из генов алкан-монооксигеназы (*alkB1*, *alkB2* и *almA*). Другие гены метаболизма алканов, алкогольдегидрогеназа (EC 1.1.99.20 и EC 1.1.1.1) и альдегиддегидрогеназа (EC 1.2.1.3), расположены в одном кластере с геном *alkB* у *H. titanicae* TAT1 и на отдельных участках генома у *M. lutaensis* KAZ22. Дополнительные сведения о генах деградации *n*-алканов представлены в табл. S3.

Гены метаболизма осмопротекторов. В геномах штаммов *H. titanicae* TAT1 и *M. lutaensis* KAZ22 выполнен поиск генов образования основных осмопротекторов – бетаина и эктоина, которые в базе данных KEGG включены в путь “Метаболизм глицина, серина и треонина”. В геноме *H. titanicae* TAT1 обнаружен кластер генов *betIBA* (табл. S4, рис. S5а), детерминирующих ферменты окисления холина до бетаинового альдегида (холиндегидрогеназа, EC 1.1.99.1) и далее до бетаина (бетаин-альдегиддегидрогеназа, (EC 1.2.1.8), что свидетельствует о потенциальной возможности синтеза бетаина. Кроме того, в геноме *H. titanicae* TAT1 присутствуют все гены образования осмопротекторов эктоина и гидроксiekтоина из аспартата и треонина через промежуточный метаболит аспарат-полуальдегид. Гены синтеза эктоина (*ectA*, *ectB*

и *ectC*), как и в геномах других бактерий рода *Halomonas*, объединены в кластер, кодирующий диаминобутиратацетилтрансферазу (ЕС 2.3.1.178) (*EctA*), диаминобутираттрансаминазу (ЕС 2.6.1.76) (*EctB*) и эктоинсинтазу (ЕС 4.2.1.108) (*EctC*) (рис. 4в). Кроме того, в геноме штамма ТАТ1 аннотированы 2 гена (*ectD1* и *ectD2*), предположительно детерминирующие эктоиндегидрогеназу (ЕС 1.14.11.55), которые расположены каждый в различных участках генома (рис. 4в). Аналогичные системы образования осмопротекторов были подробно рассмотрены у *Chromohalobacter salexigens* (ранее *Halomonas elongata* DSM 3043) (Vargas et al., 2008).

В геноме штамма *M. lutaensis* KAZ22 отсутствовали гены образования бетаина. В то же время в геноме этого штамма также аннотированы все гены образования осмопротекторов эктоина и гидроксидэктоина (рис. S56). Локализация этих генов в геноме похожа на локализацию аналогичных генов в геноме *M. hydrocarbonoclasticus* (ранее *M. aquaeoli*) (Vargas et al., 2008). Гены *ectA* и *ectB* сгруппированы в единый кластер вместе с геном *ask* аспартаткиназы (ЕС 2.7.2.4), а единственные гены *ectC* и *ectD* локализованы отдельно на различных участках генома (рис. 4г). Дополнительные сведения о генах синтеза осмопротекторов представлены в табл. S4.

Гены метаболизма бензоата у исследованных галофильных бактерий. В геноме штамма *M. lutaensis* KAZ22 наряду с несколькими генами деградации *n*-алканов, присутствовало большое количество генов разложения ароматических соединений, таких как бензол, катехол, бензоат и фенилацетат. Бензоат является центраболитом деградации многих ароматических соединений. В геноме *H. titanicae* ТАТ1 представлены гены, кодирующие ферменты аэробной деградации бензоата – бензоат-1,2-дигидроксициклогексациен-дегидрогеназу (ЕС 1.14.12.10) и дигидроксициклогексациен-дегидрогеназу (ЕС 1.3.1.25), которые катаболизируют превращения бензоата до катехола. Кроме того, в его геноме аннотированы гены всех ферментов *орто*-расщепления катехола, начиная с катехол 1,2-диоксигеназы (ЕС 1.13.11.1), как до сукцинил-КоА, так и до пирувата/ацетил-КоА, а также гены фермента деградации фенола и толуола – толуол/фенол-2-монооксигеназы (ЕС 1.14.13.244) (рис. S6). Отметим, что у галофильной бактерии *Amycolicoccus subflavus* DQS3-9A1^T при мульткопийности генов деградации *n*-алканов, отсутствовали гены деградации ароматических соединений (Nie et al., 2013). В отличие от этой бактерии, в геноме *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1^T были обнаружены гены ферментов полных путей катаболизма ароматических соединений, но только единственный ген *ladA* кодировал деградацию *n*-алканов (Nie et al., 2012), хотя оба микроорганизма были выделены из загрязненных нефтью сред обитания.

Гены метаболизм азота у штамма *H. titanicae* ТАТ1.

В анаэробных условиях штамм *H. titanicae* ТАТ1 рос гетеротрофно на органических субстратах, восстанавливая нитрат до нитрита. Феноменологические наблюдения восстановления нитрата до нитрита штаммом ТАТ1 подтвердились при анализе его генома, в котором были аннотированы гены ферментов, участвующих в диссимиляционном восстановлении нитрата до аммония: нитратредуктаза (гены *narG*, *narZ*, *nxrA*) (ЕС 1.7.5.1; 1.7.99.4), которая катализирует восстановление нитрата до нитрита, и нитритредуктаза (ген *nirB*) (ЕС 1.7.1.15), завершающая этот процесс восстановлением нитрита до аммония. Кроме того, в геноме *H. titanicae* ТАТ1, так же как в геноме типового штамма *H. titanicae* ВН1^T, были аннотированы гены неполного пути денитрификации, в котором отсутствовал ключевой ген нитритредуктазы (*nirK*) (ЕС 1.7.2.1), кодирующий восстановление нитрита до оксида азота (рис. S7а). Это свойство ранее отмечалось для ряда штаммов группы *H. titanicae* (Wang, Shao, 2021).

Штамм *M. lutaensis* KAZ22, как и типовой штамм *M. lutaensis* T5054^T, был неспособен расти анаэробно и восстанавливать нитрат, что подтверждалось отсутствием в его геноме генов нитратредуктаз. Однако в нем был аннотирован ген нитритредуктазы (ЕС 1.7.1.4), восстанавливающей нитрит до аммония в процессе ассимиляционной нитратредукции (рис. S7б).

Приведенные результаты изучения физиологии и анализ геномов галофильных/галотолерантных бактерий *Marinobacter lutaensis* KAZ22 и *Halomonas titanicae* ТАТ1, выделенных из нефтяных пластов, свидетельствует о приспособленности штаммов к высокой солености среды местообитания. Штаммы способны расти при температуре нефтяного пласта, используя сырую нефть в аэробных условиях. Наличие трех генов *alkB1*, *alkB2* и *almA* алкан-монооксигеназ у штамма *M. lutaensis* KAZ22 позволяет ему эффективно деградировать *n*-алканы нефти, тогда как использование *n*-алканов нефти штаммом *H. titanicae* ТАТ1, детерминированное геном алкан-1-монооксигеназы *alkB*, было слабым. Рост при высокой солености штамма ТАТ1 был обусловлен наличием генов синтеза осмопротекторов бетаина, эктоина и гидроксидэктоина, а штамма KAZ22 – наличием генов синтеза эктоина и гидроксидэктоина.

Способность штамма ТАТ1 накапливать нитрит в среде, обусловленная отсутствием гена нитритредуктазы *nir*, может быть использована в биотехнологии подавления образования сероводорода в нефтяном пласте. Сероводород вызывает коррозию стального оборудования, порчу нефти и осаждение сульфидов, что, в свою очередь, приводит к снижению проницаемости пласта и приемистости нагнетательных скважин (An et al.,

2017). Известно, что нитрит подавляет рост бактерий-продуцентов сероводорода посредством ингибирования активности α -субъединицы сульфитредуктазы (*dsrA*), а также химически окисляет сульфид, снижая его концентрацию в среде. Кроме того, денитрифицирующие бактерии имеют конкурентное преимущество над сульфидогенами в использовании доступных субстратов, поскольку восстановление нитрата дает больший выход энергии, чем восстановление сульфата до сульфида. Таким образом, штамм *H. titanicae* TAT1 может быть использован совместно с нитратами для биоаугментации нефтяных пластов с высокой минерализацией пластовой воды с целью подавления коррозии и снижения содержания сульфида, а штамм *M. lutaensis* KAZ22 – для очистки от нефтяных загрязнений и увеличения нефтеотдачи пластов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Секвенирование и анализ геномов выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00019). Выделение культур и физиологические исследования были выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беляев С.С., Борзенков И.А., Назина Т.Н., Розанова Е.П., Глумов И.Ф., Ибатуллин Р.Р., Иванов М.В. Использование микроорганизмов в биотехнологии повышения нефтеизвлечения // *Микробиология*. 2004. Т. 73. С. 687–697.
- Belyaev S.S., Borzenkov I.A., Nazina T.N., Rozanova E.P., Glumov I.F., Ibatullin R.R., Ivanov M.V. Use of microorganisms in the biotechnology for the enhancement of oil recovery // *Microbiology (Moscow)*. 2004. V. 73. P. 590–598.
- Борзенков И.А., Милехина Е.И., Готоева М.Т., Розанова Е.П., Беляев С.С. Свойства углеводородокисляющих бактерий, изолированных из нефтяных месторождений Татарстана, Западной Сибири и Вьетнама // *Микробиология*. 2006. Т. 75. С. 82–89.
- Borzenkov I.A., Milekhina E.I., Gotoeva M.T., Rozanova E.P., Belyaev S.S. The properties of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from the oilfields of Tatarstan, Western Siberia, and Vietnam // *Microbiology (Moscow)*. 2006. V. 75. P. 66–72.
<https://doi.org/10.1134/S0026261706010127>
- Звягинцева И.С., Беляев С.С., Борзенков И.А., Кострикина Н.А., Милехина Н.Н., Иванов М.В. Галофильные археобактерии из нефтяного месторождения Каламкасс // *Микробиология*. 1995. Т. 64. С. 83–87.
- Zvyagintseva I.S., Belyaev S.S., Borzenkov I.A., Kostrikina N.A., Milekhina E.I., Ivanov M.V. Halophilic archaeobacteria from the Kalamkass oil field // *Microbiology (Moscow)*. 1995. V. 64. P. 67–71.
- Турова Т.П., Назина Т.Н., Михайлова Е.М., Родионова Т.А., Екимов А.Н., Машукова А.В., Полтараус А.Б. Гомологи *alkB* гена термофильных бактерий рода *Geobacillus* // *Мол. биология*. 2008. Т. 42. С. 247–257.
- Tourova T.P., Nazina T.N., Mikhailova E.M., Rodionova T.A., Ekimov A.N., Mashukova A.V., Poltarau A.B. *AlkB* homologs in thermophilic bacteria of the genus *Geobacillus* // *Mol. Biol.* 2008. V. 42. P. 217–226.
- Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Семенова Е.М., Полтараус А.Б., Назина Т.Н. Разнообразие генов биodeградации *n*-алканов *alkB* у термофильных углеводородокисляющих бактерий родов *Geobacillus*, *Parageobacillus* и *Aeribacillus* // *Микробиология*. 2018. Т. 87. С. 225–232.
<https://doi.org/10.7868/S0026365618030011>
- Tourova T.P., Sokolova D.Sh., Semenova E.M., Poltarau A.B., Nazina T.N. Diversity of the *alkB* genes of *n*-alkane biodegradation in thermophilic hydrocarbon-oxidizing bacteria of the genera *Geobacillus*, *Parageobacillus*, and *Aeribacillus* // *Microbiology (Moscow)*. 2018. V. 87. P. 301–307.
<https://doi.org/10.1134/S002626171803013X>
- Al-Mailem D.M., Sorkhoh N.A., Al-Awadhi H., Eliyas M., Radwan S.S. Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf // *Extremophiles*. 2010. V. 14. P. 321–328.
<https://doi.org/10.1007/s00792-010-0312-9>
- An B.A., Shen Y., Voordouw G. Control of sulfide production in high salinity Bakken shale oil reservoirs by halophilic bacteria reducing nitrate to nitrite // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 1164.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01164>
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Pribylski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // *J. Comput. Biol.* 2012. V. 19. P. 455–477.
<https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Ben Ali Gam Z., Abdelkafi S., Casalot L., Tholozan J.L., Oueslati R., Labat M. *Modicisalibacter tunisiensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, moderately halophilic bacterium isolated from an oilfield-water injection sample, and emended description of the family *Halomonadaceae* Franzmann et al. 1989 emend Dobson and Franzmann 1996 emend. Ntougias et al. 2007 // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007. V. 57. P. 2307–2313.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.65088-0>
- Bødtker G., Lysnes K., Torsvik T., Bjørnstad E.Ø., Sunde E. Microbial analysis of backflowed injection water from a nitrate-treated North Sea oil reservoir // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 36. P. 439–450.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. V. 30. P. 2114–2120.
- Boonmak C., Takahashi Y., Morikawa M. Cloning and expression of three *ladA*-type alkane monooxygenase genes

- from an extremely thermophilic alkane-degrading bacterium *Geobacillus thermoleovorans* B23 // *Extremophiles*. 2014. V. 18. P. 515–523.
- Bryanskaya A.V., Rozanov A.S., Slynko N.M., Shekhovtsov S.V., Peltek S.E.* *Geobacillus icigianus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. V. 65. P. 864–869.
- Chaumeil P.-A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H.* GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database // *Bioinformatics*. 2019. V. 36. P. 1925–1927.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848>
- Edbeib M.F., Wahab R.A., Huyop F.* Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 32. P. 135.
<https://doi.org/10.1007/s11274-016-2081-9>
- Fathepure B.Z.* Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5. Art. 173. P. 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00173>
- Grouzdev D.S., Sokolova D.S., Poltarau A.B., Nazina T.N.* Draft genome sequence of *Halomonas titanicae* strain TAT1, a hydrocarbon-oxidizing halophilic bacterium isolated from a petroleum reservoir in Russia // *Microbiol. Resour. Announc.* 2020. V. 9. e01255-20.
<https://doi.org/10.1128/MRA.01255-20>
- Huu N.B., Denner E.B., Ha D.T., Wanner G., Stan-Lotter H.* *Marinobacter aquaeolei* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999. V. 49. P. 367–375.
<https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-367>
- Jain C., Rodriguez R. L.M., Phillippy A.M., Konstantinidis K.T., Aluru S.* High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. P. 5114.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>
- Kaye J.Z., Sylvan J.B., Edwards K.J., Baross J.A.* *Halomonas* and *Marinobacter* ecotypes from hydrothermal vent, sub-seafloor and deep-sea environments // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2010. V. 75. Art. 1. P. 123–133.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00984.x>
- Lane D.J.* 16S/23S rRNA sequencing // *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* / Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M. N.Y.: John Wiley & Sons, 1991. P. 115–175.
- Luo Y.J., Xie B.S., Lv X.L., Cai M., Wang Y.N., Cui H.L., Cai H., Wu X.L.* *Marinobacter shengliensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from oil-contaminated saline soil // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2015. V. 107. P. 1085–1094.
<https://doi.org/10.1007/s10482-015-0401-y>
- 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 Bioinform.* 2013. V. 14. Art. 60.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>
- Mnij S., Chamkha M., Sayadi S.* Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions // *J. Appl. Microbiol.* 2009. V. 107. P. 785–794.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04251.x>
- Nazina T.N., Shestakova N.M., Pavlova N.K., Tatarkin Y.V., Ivoilov V.S., Khisametdinov M.R., Sokolova D.Sh., Babich T.L., Tourova T.P., Poltarau A.B., Belyaev S.S., Ivanov M.V.* Functional and phylogenetic microbial diversity in formation waters of a low-temperature carbonate petroleum reservoir // *Int. Biodeter. Biodegr.* 2013. V. 81. P. 71–81.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.008>
- Nie Y., Tang Y.-Q., Li Y., Chi C.-Q., Cai M., Wu X.-L.* The genome sequence of *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1^T reveals its genetic basis for crude oil degradation and adaptation to the saline soil // *PLoS One*. 2012. V. 7. Art. e31261.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031261>
- Nie Y., Fang H., Li Y., Chi C.-Q., Tang Y.-Q., Wu X.-L.* The genome of the moderate halophile *Amycolicococcus subflavus* DQS3-9A1^T reveals four alkane hydroxylation systems and provides some clues on the genetic basis for its adaptation to a petroleum environment // *PLoS One*. 2013. V. 8. Art. e70986.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070986>
- Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W.* CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes // *Genome Res.* 2015. V. 25. P. 1043–1055.
<https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Sanchez-Porro C., Kaur B., Mann H., Ventosa A.* *Halomonas titanicae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the RMS Titanic // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010. V. 60. P. 2768–2774.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.020628-0>
- Sokolova D.S., Semenova E.M., Grouzdev D.S., Bidzhieva S.K., Babich T.L., Loiko N.G., Ershov A.P., Kadnikov V.V., Belesky A.V., Mardanov A.V., Zhaparov N.S., Nazina T.N.* Sulfidogenic microbial communities of the Uzen high-temperature oil field in Kazakhstan // *Microorganisms*. 2021. V. 9. P. 1818.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9091818>
- Tatusova T., Di Cuccio M., Badretin A., Chetvernin V., Ciuffo S., Li W.* Prokaryotic Genome Annotation Pipeline // *The NCBI Handbook*, 2nd ed. National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD. 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK174280>
- Vargas C., Argandoña M., Reina-Bueno M., Rodríguez-Moya J., Fernández-Aunión C., Nieto J.J.* Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance // *Saline Syst.* 2008. V. 4. Art. 14.
<https://doi.org/10.1186/1746-1448-4-14>
- Wang W., Shao Z.* Diversity of flavin-binding monooxygenase genes (*almA*) in marine bacteria capable of degradation long-chain alkanes // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011. V. 80. P. 523–533.
- Wang L., Shao Z.* Aerobic denitrification and heterotrophic sulfur oxidation in the genus *Halomonas* revealed by six novel species characterizations and genome-based analysis // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. Art. 652766.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.652766>
- Wang L., Wang W., Lai Q., Shao Z.* Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean // *Environ. Microbiol.* 2010. V. 12. P. 1230–1242.
- Wilson K.* Preparation of genomic DNA from bacteria // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2001. Ch. 2. Unit 2.4.
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56>

Genomic and Physiological Characterization of Halophilic Bacteria of the Genera *Halomonas* and *Marinobacter* from Petroleum Reservoirs

T. P. Tourova¹, D. S. Sokolova¹, E. M. Semenova¹, A. P. Ershov¹, D. S. Grouzdev², and T. N. Nazina^{1,*}

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Centre of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²SciBear OU, Tallinn, 10115 Estonia

*e-mail: nazina@inmi.ru

Received January 25, 2022; revised January 27, 2022; accepted January 27, 2022

Abstract—During the exploitation of oil reservoirs with highly mineralized waters, water separated from oil is pumped back into the reservoirs, which in some cases leads to an increase in ambient salinity and limits the possibility of application of biotechnologies for the enhancement of oil recovery. The microbial community of such oil fields has been relatively scarcely studied. Two strains of halophilic hydrocarbon-oxidizing bacteria, *Halomonas titanicae* TAT1 and *Marinobacter lutaensis* KAZ22 were isolated from oil fields with mineralized reservoir water. Their physiological and genomic characteristics determining their presence in these habitats and the possibility of biotechnological application were investigated. The strains *H. titanicae* TAT1 and *M. lutaensis* KAZ22 grew aerobically on crude oil in the temperature range from 4 to 42 and from 22 to 55°C, respectively, and had growth optima at salinity 2.0–12 and 5–10% NaCl (wt/vol). Phenomenological observations of the degradation of oil *n*-alkanes were confirmed by the detection of three genes (*alkB1*, *alkB2*, and *almA*) encoding alkane-1-monooxygenases in the genome of strain KAZ22, and of one *alkB* gene in the genome of strain TAT1. In the genome of the *H. titanicae* TAT1, all the genes for formation of osmoprotectors betaine, ectoin, and hydroxyectoin were annotated, and in the genome of *M. lutaensis* KAZ22, the genes for the formation of ectoin and hydroxyectoin were annotated. The growth of strain KAZ22 on oil was accompanied by a decrease in the surface tension of the medium by more than 20 mN/m. Due to the absence of the *nirK* nitrite reductase gene, anaerobic growth of strain *H. titanicae* TAT1 in a medium with acetate and nitrate resulted in accumulation of ~100 mg/L of nitrite, which can inhibit the growth of sulfidogens. The biological features of the strains and the results of genome analysis allow us to recommend injection of nitrate and strain *H. titanicae* TAT1 for bioaugmentation of oil reservoirs with mineralized reservoir water to suppress corrosion and decrease sulfide content, and of *M. lutaensis* KAZ22 for cleaning from oil pollution and increasing the oil recovery from reservoirs.

Keywords: petroleum reservoirs, halophiles, *Halomonas*, *Marinobacter*, genomes, *alkB* and *almA* genes, *n*-alkane oxidation