

УДК 574.589

**ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ –
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ МИКРОБНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ
САНИТАРНО-ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ**

Филиппова Ю. Ю., Нохрин Д. Ю., Девятова Е. В., Андреева С. В.

*ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия
E-mail: andreeva_sv81@mail.ru*

В работе с помощью метода газовой хроматографии – масс-спектрометрии микробных маркеров (ГХМС ММ) проведена оценка численности некоторых представителей микробиоты в воде 4 озёр Челябинской области с разной антропогенной нагрузкой. Обнаружено 28 таксонов микроорганизмов, из которых 13 (46,4 %) были идентифицированы до вида, а остальные 15 (53,6 %) – до рода. Показано, что метод ГХМС ММ может быть применен для оценки санитарно значимых показателей качества воды. Кроме того, он также может быть использован для определения численности и структуры сообщества микробиоты, которые способны отражать уровень антропогенной нагрузки на водоём.

Ключевые слова: микробные сообщества, метод газовой хроматографии – масс-спектрометрии микробных маркеров, озера, санитарно-экологические показатели качества воды.

ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы повсеместно распространены во всех типах озёр разного трофического состояния. Они играют ключевую роль в пресноводных экосистемах, участвуя в глобальных потоках энергии и биогеохимических циклах (С, N, P, S и другие элементы) [1–3]. Кроме того, бактерии выступают важными индикаторами загрязнённости водоёмов питьевого и рекреационного назначения [4], а благодаря способности к разложению органических соединений, микробные сообщества способствуют их самоочищению [5].

Изучение санитарно-эпидемиологических показателей в водах питьевого и рекреационного назначения традиционно основывается на классическом культуральном бактериологическом методе [6–7]. Несмотря на широкую распространённость, метод имеет определенные ограничения и недостатки, прежде всего, высокую трудоемкость и длительность исследования (5–7 дней), а также низкую чувствительность и трудности в культивировании и идентификации анаэробных микроорганизмов [8].

Разработка и применение молекулярных методов исследования предоставили новые инструменты для изучения микробиоты, особенно образцов проб из окружающей среды [9].

Методы детекции микроорганизмов с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) или ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) позволяют определить наличие и относительное количество ДНК конкретного

микроорганизма, или нескольких сразу (мультиплексные техники). Преимуществами методов ПЦР являются короткое время исследования, относительно низкая стоимость оборудования и реактивов, высокая чувствительность и точность, но они не предназначены для оценки микробного разнообразия (показатель Общее микробное число – ОМЧ) и структуры сообщества [9–11].

Внедрение в практику методов геномики, прежде всего, клонирования и высокопроизводительного секвенирования, напротив, дало возможность проводить максимально широкий таксономический и филогенетический анализ и определять относительную структуру сообществ, т.к. методы являются полуколичественными [9, 12]. Метод ДНК-биочипов, помимо обнаружения эпидемиологически значимых патогенов, позволяет быстро проводить количественную оценку и функциональный анализ сообщества бактерий. Однако внедрение методов геномики в практику идет медленно, т.к. они трудоёмки, требуют наличия дорогостоящего оборудования, реактивов, и высококвалифицированного персонала, особенно в области анализа данных [9].

В данной работе для определения санитарно-экологических показателей (санитарно значимых микроорганизмов и структуры сообщества) в пробах воды нами предложено использовать метод газовой хроматографии – масс-спектрометрии микробных маркеров (ГХМС ММ), разработанный профессором Осиповым Г. А. [13]. Метод основан на детектировании специфических жирных кислот (ЖК), альдегидов, спиртов и стеринов клеточной стенки микроорганизмов непосредственно в пробе, без получения чистой культуры. Липиды бактерий очень разнообразны по своей структуре и обладают большой таксономической ценностью [14]. Поэтому метод сходен с генетическим анализом, состав ЖК детерминирован в ДНК, а стабильность набора ЖК, составляющих клетки микроорганизмов, подтверждается исследованиями в области бактериальной палеонтологии [15, 16]. В отличие от молекулярно-генетического анализа на основе 16s рНК, ГХМС ММ позволяет одновременно выявлять и проводить количественную оценку более 50 родов/видов микроорганизмов в одном образце. Преимуществами метода также являются высокая скорость получения результата (анализ одного образца занимает около 2,5 часов) [8], относительно низкая стоимость оборудования и реактивов, и отсутствие стадии биоинформационного анализа данных, для которого требуется дополнительное обучение персонала. Всё вышеперечисленное позволило внедрить метод в клиническую практику, где он применяется для исследования пристеночной микробиоты тонкого кишечника здоровых людей [17], дисбактериозов [18], сепсиса [19], заболеваний кожи [20] и некоторых нейропсихических состояний [21, 22].

Кроме того, к настоящему времени существуют обширные библиотеки ЖК бактерий (подобные библиотекам белков для технологии MALDI-TOF спектрометрии), что позволяет расширить спектр определяемых микроорганизмов, включив в анализ показатели, значимые для конкретного исследуемого образца, например, маркёры цианобактерий для проб воды [23].

Среди объектов окружающей среды применение метода было апробировано на пробах почв [24], но не водных объектах, поэтому, **цель исследования:** оценить

возможность применения метода ГХМС ММ для оценки санитарно-экологических характеристик микробных сообществ водоёмов питьевого и рекреационного назначения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор проб воды проводился на 4 водоёмах Челябинской области. Пробы отбирали с 3 горизонтов (поверхностного, среднего и придонного). Глубина в точках отбора проб варьировала от 1,7 до 7,3 м и составила в среднем 3,7 м. Температура воды варьировала от 0,6 до 8,7 и составила в среднем 4,2 °С. Забор воды производили с помощью батометра в стерильные полипропиленовые бутылки с учетом требований асептики. Отобранные пробы воды маркировали и доставляли в лабораторию в контейнерах-холодильниках при температуре 4–10 °С в течение 2–6 ч после отбора.

Для обнаружения санитарно значимых микроорганизмов и особенностей структуры бактериального сообщества применяли метод ГХМС ММ. Мембрану, полученную после концентрации проб воды методом мембранных фильтров, высушивали в метаноле, подвергали кислотному метанолизу, экстрагировали гексаном и обрабатывали N,O-бис(триметилсилил)-трифторацетамидом. Полученную смесь эфиров анализировали с помощью газового хромато-масс-спектрометра Маэстро (ООО «Интерлаб», Россия) на капиллярной колонке HP-5ms (Hewlett-Packard, США). Условия хроматографического разделения: начальная температура 130 °С, выдержка в течении 0,5 мин, нагрев 70 °С/мин до 320 °С, выдержка при конечной температуре 6 мин. Режим – селективных ионов, газ-носитель – гелий, поток – 1,2 мл/мин в режиме без деления потока. В результате получали хроматограммы веществ липидной природы, содержащихся в образце воды. Интерпретацию результатов хроматографии и сопоставление липидных маркёров с содержанием конкретного микроорганизма проводили с помощью программы, прилагаемой к прибору, с применением внутреннего стандарта – дейтерометилового эфира тридекановой кислоты [21]. Чувствительность метода – 1×10^4 КОЕ/мл.

В ходе статистического анализа полученных данных использовали методы описательной статистики, выборочных сравнений и многомерную технику визуализации данных. Для всех операционных таксономических единиц (ОТЕ) рассчитывали среднее геометрическое значение для водоёма с 95 %-ными доверительными интервалами (95 % ДИ). Для этого сначала концентрации в КОЕ/мл логарифмировали по основанию 10. Далее, в случае выборок с полными наблюдениями (в которых не было проб с концентрациями ниже предела обнаружения), вычисляли средние значения логарифмов с 95 % ДИ, рассчитанными техникой непараметрического бутстрепа (метод процентилей, $n=9999$) в пакете PAST (version 4.05 [25]). В случае наличия в выборке цензурированных наблюдений типа «менее чем» средние значения логарифмов находили методом Каплана-Мейера, а 95 % ДИ для них – бутстрепом (метод процентилей, $n=9999$) для метода Каплана – Мейера в пакете Scout 2008 (version 1.00.01 [26]). На последнем этапе полученные таким образом средние значения логарифмов и границ ДИ

ретрансформировали в исходную шкалу путём возведения 10 в эти степени [27] и выражали в единицах $\times 10^5$ КОЕ/мл. Для сравнения водоёмов по концентрациям микроорганизмов использовали ранговый *H*-критерий Краскела – Уоллиса с попарными апостериорными сравнениями методом Данна в пакете PAST. Для визуализации относительных величин концентраций микроорганизмов, а также для одновременной оценки сходства водоёмов, и микроорганизмов, строили кластерную тепловую карту [28]. При этом для группировки строк и столбцов матрицы данных применяли иерархический кластерный анализ с использованием в качестве меры сходства коэффициента корреляции Спирмена, а в качестве агломеративного алгоритма – метода Уорда [29]. Расчёты выполнены в пакете pheatmap [30] программно-статистической среды R [31].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение концентрации микроорганизмов в водной среде методом ГХМС ММ

Для оценки универсальности метода ГХМС ММ и возможности его применения для детекции санитарно значимых микроорганизмов в пробах воды нами был проведён анализ бактериальных сообществ трёх озёр (Смолино, Первое, Чебаркуль) и водохранилища (Шершнёвское) (рис. 1.), испытывающих разный уровень антропогенной нагрузки: от умеренного до сильного.

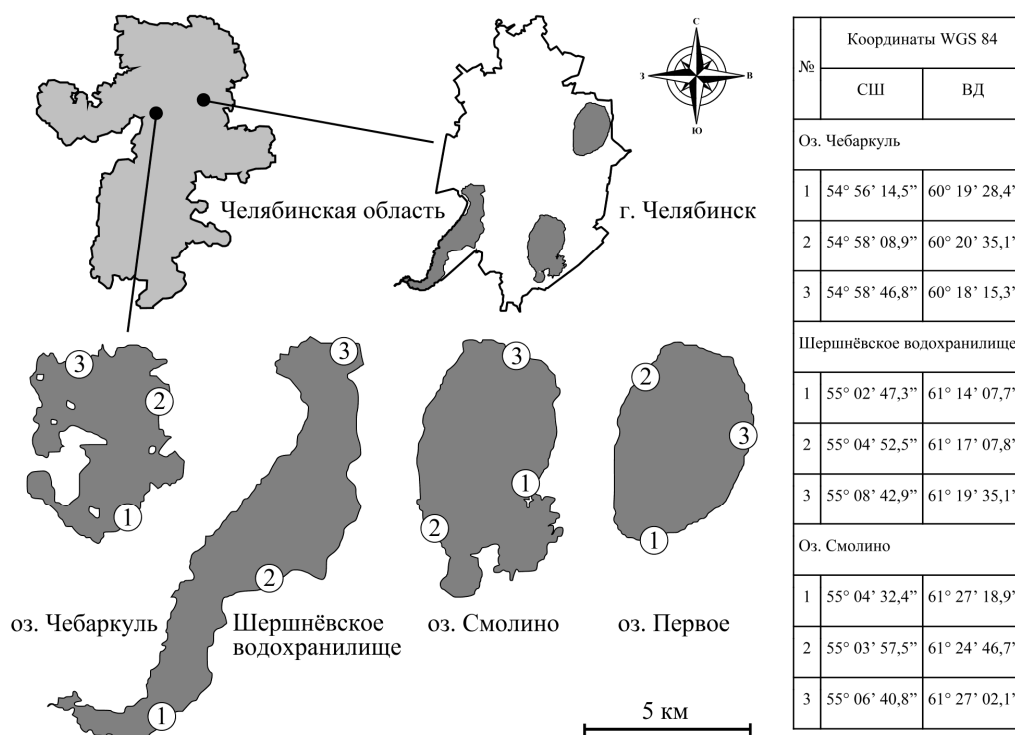


Рис. 1. Точки отбора проб воды на водоёмах Челябинской области.

В результате работы из 55 таксономических единиц, которые можно было обнаружить с помощью метода ГХМС ММ, в исследуемых пробах нами было найдено 28 таксонов микроорганизмов. Общий вид хроматограммы с маркерами некоторых бактерий представлен на рис. 2. Из 28 родов/видов 13 (46,4 %) были идентифицированы до вида, а остальные 15 (53,6 %) – до рода. Полученные данные представлены в табл. 1.

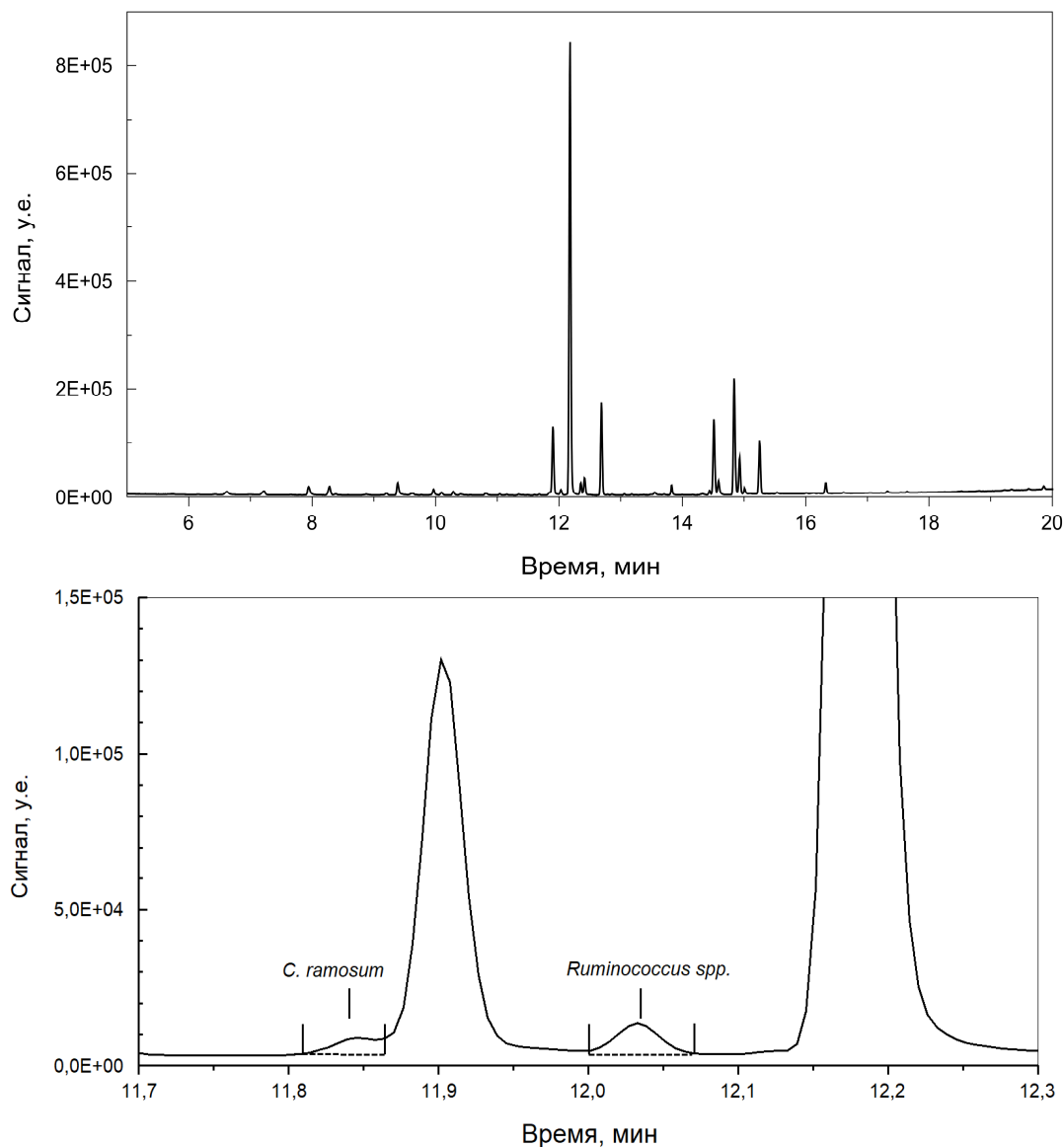


Рис. 2. Определение микроорганизмов методом ГХ-МСММ. Общий вид хроматограммы пробы воды Шершневого водохранилища (вверху) и участок с пиками микроорганизмов (внизу).

ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ...

Выявленные микроорганизмы относились к 5 основным типам бактерий (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*) и царству грибов (табл. 1). Среди них были идентифицированы микроорганизмы, включенные в санитарно-эпидемиологические показатели, прежде всего, бактерии группы кишечной палочки (*Escherichia coli*) и *Enterococcus spp.* – показатели свежего фекального загрязнения; *Clostridium perfringens* – показатели давнего фекального загрязнения; условно-патогенные бактерии, такие как *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и неферментирующие грамотрицательные бактерии (*Moraxella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*).

Таблица 1
Средние концентрации микроорганизмов в водоёмах Челябинской области,
10⁵ КОЕ/мл [95 % ДИ]

Микроорганизм	Смолино	Первое	Шершни	Чебаркуль	<i>H</i> <i>P</i>
<i>Bacteroidetes</i>					
<i>Bacteroides fragilis</i>	5,0 [4,3; 6,4]	4,6 [3,7; 5,8]	4,6 [4,0; 5,8]	12,4 [10,2; 15,1]	19,50 <0,001
<i>Prevotella spp.</i>	49,0 [41,6; 57,4]	13,9 [11,1; 18,0]	18,1 [13,7; 22,6]	40,2 [33,6; 47,7]	25,5 <0,001
<i>Firmicutes</i>					
<i>Eubacterium spp.</i>	28393 [24876; 32971]	10046 [3436; 27796]	28920 [22879; 36690]	1424 [1221; 1640]	15,57 0,001
<i>Bacillus cereus</i>	159 [123; 210]	55,1 [46,7; 64,0]	77,8 [47,6; 154]	107 [78,2; 148]	14,95 0,002
<i>Bacillus megaterium</i>	25,5 [15,3; 45,3]	14,3 [11,0; 19,1]	20,2 [11,0; 40,7]	16,6 [12,2; 27,7]	3,23 0,357
<i>Blautia coccooides</i>	<72,8	<1	<129	<1	4,63 0,201
<i>Clostridium spp.</i>	1227 [855; 1724]	403 [232; 774]	553 [296; 1059]	256 [181; 365]	11,46 0,009
<i>Clostridium hystolyticum</i>	<1	<83	79,1 [65,6; 137,4]	89,8 [44,0; 394]	8,72 0,033
<i>Clostridium perfringens</i>	1,2 [1,0; 2,0]	1,4 [1,1; 1,7]	1,9 [1,2; 5,0]	3,9 [2,3; 6,7]	11,54 0,009
<i>Clostridium ramosum</i>	<1	<1	1287 –	<1	9,19 0,027
<i>Enterococcus spp.</i>	36,6 [24,3; 64,4]	15,5 [7,3; 34,5]	3,0 [1,2; 14,4]	5,9 [3,0; 13,7]	7,31 0,063
<i>Streptococcus spp.</i>	625 [474; 770]	331 [262; 416]	227 [147; 531]	351 [263; 486]	12,03 0,007

Продолжение таблицы 1

<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	678 [402; 938]	727 [524; 955]	590 [399; 1097]	713 [431; 1054]	5,67 0,129
<i>Ruminococcus spp.</i>	<349 –	139 [99,7; 313]	437 [237; 1550]	688 [226; 1385]	15,31 0,002
<i>Staphylococcus aureus</i>	78,3 [62,4; 102]	40,5 [28,8; 53,2]	74,4 [39,3; 185]	68,1 [41,0; 116]	6,22 0,101
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4,4 [2,7; 7,9]	2,1 [2,0; 3,0]	4,8 [1,8; 21,2]	24,4 [15,2; 53,2]	7,55 0,056
Actinobacteria					
<i>Actinomyces spp.</i>	174 [130; 276]	121 [91,6; 150]	134 [73,6; 335]	183 [81,4; 398]	3,70 0,296
<i>Eggerthella lenta</i>	<1	<1	<97,6	64,2 [57,0; 167]	8,07 0,045
<i>Propionibacterium spp.</i>	83,3 [59,9; 133]	90,2 [63,5; 123]	75,3 [40,3; 131]	162,8 [140; 189]	10,17 0,017
<i>Corynebacterium spp.</i>	<3	9,9 [6,1; 21,0]	9,1 [5,9; 21,0]	11,2 [5,2; 47,5]	4,908 0,179
<i>Pseudonocardia spp.</i>	44,7 [37,5; 54,6]	35,9 [28,9; 47,8]	62,5 [28,8; 160]	80,9 [47,1; 143]	5,21 0,157
<i>Rhodococcus spp.</i>	56,6 [45,7; 70,5]	57,5 [39,9; 97,7]	80,0 [39,3; 203]	79,8 [66,1; 245]	4,10 0,251
<i>Streptomyces spp.</i>	14,4 [7,3; 25,2]	15,8 [12,6; 21,2]	3,8 [3,0; 8,0]	18,7 [17,0; 27,0]	11,47 0,009
Proteobacteria					
<i>Moraxella spp./ Acinetobacter spp.</i>	32,5 [28,1; 38,2]	16,0 [10,6; 23,8]	34,2 [16,1; 81,8]	33,1 [25,9; 40,6]	5,69 0,128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24,8 [16,2; 51,3]	8,1 [6,3; 10,0]	70,8 [23,7; 219]	15,3 [12,1; 19,2]	19,43 <0,001
<i>Escherichia coli</i>	6,4 [5,0; 31,4]	8,8 [7,3; 13,0]	24,4 [14,3; 40,6]	<1	20,84 <0,001
Fungi					
<i>Aspergillus spp.</i>	31,3 [25,1; 39,6]	12,5 [3,9; 41,0]	13,5 [8,8; 24,9]	5,2 [4,4; 6,9]	11,62 0,009
<i>Candida spp.</i>	<54,2	3,6 [1,4; 20,7]	<86,5	59,2 [26,6; 133]	11,33 0,010

Таким образом, полученные результаты позволяют нам предложить метод ГХМС ММ в качестве альтернативного бактериологическому при оценке качества питьевой воды.

Особенности статистического анализа данных, полученных методом ГХМС ММ.

Как и любой хроматографический метод, метод ГХМС ММ позволяет получать количественные данные в шкале отношений, представляющие собой концентрации: сначала жирных кислот, а после пересчёта – микроорганизмов. В связи с этим в ходе статистического анализа возможны две проблемы, связанные, во-первых, с особенностями анализа микробиологических данных, а во-вторых – с присутствием в выборке цензурированных наблюдений.

Известно, что численности микроорганизмов имеют асимметричные распределения, близкие к логарифмически нормальному. Поэтому при описании таких данных используют либо порядковые статистики (медиана и квартили), либо чаще геометрическое среднее вместо арифметического [32–34]. Последнее можно рассчитать как напрямую (корень n -ной степени из произведения n усредняемых значений), так и путём трёхэтапной процедуры: 1) логарифмического преобразования данных (обычно по основанию 10), 2) расчёта среднего арифметического значения логарифмов, 3) нахождения антилогарифма полученного среднего. Нами был использован второй способ, т.к. он позволяет на этапе 2 рассчитать также 95 % ДИ, а на этапе 3 ретрансформировать его границы в исходную шкалу [32].

Более серьёзную проблему для анализа представляют присутствующие в выборках неполные наблюдения – цензурированные наблюдения (ЦН), когда значение определяемого показателя оказывается ниже границ чувствительности метода (все химико-аналитические процедуры) или ниже клинически значимых границ (в микробиологии – обычно 10^5 КОЕ/мл). В этом случае нередко используемые на практике процедуры замены ЦН нулём, пороговым значением, либо его половиной не являются корректными, т.к. приводят, соответственно, к занижению, завышению, либо смещению среднего значения [35, 36]. Корректный анализ предполагает использование специальных методов учёта ЦН, основанных на разных статистических моделях и обладающих разной точностью в зависимости от характеристики данных (распределение показателя, объём выборки, доля ЦН в выборке). В данной работе нами использовался метод Каплана-Мейера, в сочетании с ресемплинг-техникой бутстрепа [36–38]. Перед его применением все концентрации микроорганизмов (в КОЕ/мл) выше предела обнаружения логарифмировали по основанию 10, а ЦН помечали предусмотренным в пакете Scout способом [39]. Далее, с помощью реализованной в программе процедуры Каплана – Мейера, получали оценки среднего значения с 95 % ДИ для него (выбирали бутстреп, метод процентилей). И наконец, путём возведения 10 в полученные значения эти средние с ДИ ретрансформировали в исходную шкалу (КОЕ/мл) и пересчитывали на 10^5 КОЕ/мл.

Таким образом, использованные нами методы анализа обеспечили единый подход к обработке асимметричных распределений микроорганизмов в выборках, содержащих как полные наблюдения, так и цензурированные: во всех случаях были рассчитаны средние геометрические значения с 95 % ДИ, полученными техникой непараметрического бутстрепа (метод процентилей, $n=9999$).

Определение особенностей микробных сообществ водоёмов с разной антропогенной нагрузкой с использованием метода ГХМС ММ

Помимо санитарно значимых микроорганизмов, метод ГХМС ММ позволяет определить численность некоторых представителей аутохтонной и аллохтонной микробиоты, тем самым может быть проведена оценка общей антропогенной нагрузки на водоем и его адаптационного резерва.

Сравнение сообществ микробиоты озёр: Смолино, Первое, Чебаркуль, и Шершнёвского водохранилища показало наличие статистически значимых различий по 17 ОТЕ (табл. 1).

Для визуализации обнаруженных различий, а также для выделения сходства водоёмов по структуре сообщества микроорганизмов и антропогенной нагрузке, была построена кластерная тепловая карта, представленная на рис. 3.

Как и все подобные изображения, она сочетает двойную кластеризацию объектов – по строкам и столбцам матрицы данных – с цветовой индикацией положения их стандартизованного значения в строке или столбце, что выбирается при построении карты. В данном случае использовалась стандартизация по строкам матрицы данных, т.е. по водоёмам. Данная процедура осуществляется следующим образом: 1) вычисляется среднее значение и стандартное значение концентрации микроорганизма во всех водоёмах, 2) из каждого значения для водоёма вычитается среднее значение, а разность делится на стандартное отклонение с получением Z-оценки, т.е. осуществляется процедура статистической стандартизации, 3) ячейка окрашивается тем интенсивнее, чем более положительным (красный цвет) или отрицательным (синий цвет) является стандартизованное значение. Таким образом красный цвет ячейки указывает на относительно высокую концентрацию данного микроорганизма в водоёме, синий цвет – на низкую (рис. 3).

Водоёмы. Верхняя дендрограмма сходства указывает на близость структуры микробиоты озёр Смолино и Первое. Несмотря на то, что оз. Первое не выделялось высокими концентрациями микроорганизмов, их ранжирование для вычисления корреляции Спирмена было сходным с таковым для оз. Смолино (рис 3). Данные водоёмы расположены в черте г. Челябинска и имеют сходство в солевом составе и несколько повышенной минерализации воды. Меньшим сходством отличалась пара водоёмов, попавших во второй кластер: Шершнёвское водохранилище и оз. Чебаркуль (рис. 3). Эти водоёмы отличает низкая техногенная нагрузка и сходство химического состава воды. Таким образом, группировка водоёмов по структуре микроорганизмов представляется логичной и, вероятно, отражает как гидрохимические особенности, так и степень антропогенной нагрузки.

Микроорганизмы. Во всех исследованных водоёмах в высоких концентрациях были выявлены представители рода *Eubacterium* (табл. 1) – грамположительные ацетогенные бактерии (ацетогены), способные к автотрофному росту с исходными одноуглеродными субстратами, такими как монооксид углерода (СО) или диоксид углерода (СО₂) с водородом (Н₂) [40]. *Eubacterium* используют путь Вуда-Льонгдала для превращения СО₂ в ацетат, который считается наиболее эффективным из всех механизмов фиксации углерода [41, 42], поскольку соответствует двум требованиям для поддержания жизни: сохранению энергии и производству биомассы. Благодаря

этим физиологическим особенностям ацетогены, которые играют важную роль в углеродном цикле – генерируют большие количества ацетата из атмосферы [40–43]. Метаболическая гибкость *Eubacterium* дает этим бактериям экологическое преимущество: они повсеместно распространены в природе и обнаруживаются как в щелочной, так и в кислой, и в высокосолевого среде, в глубоких подземных впадинах, в почве, а также в пресноводных и морских отложениях [41]. Кроме того, имеются существенные доказательства того, что некоторые виды, например *E. limosum* являются важным компонентом микробиома кишечника человека [44, 45] и различных животных [46, 47].

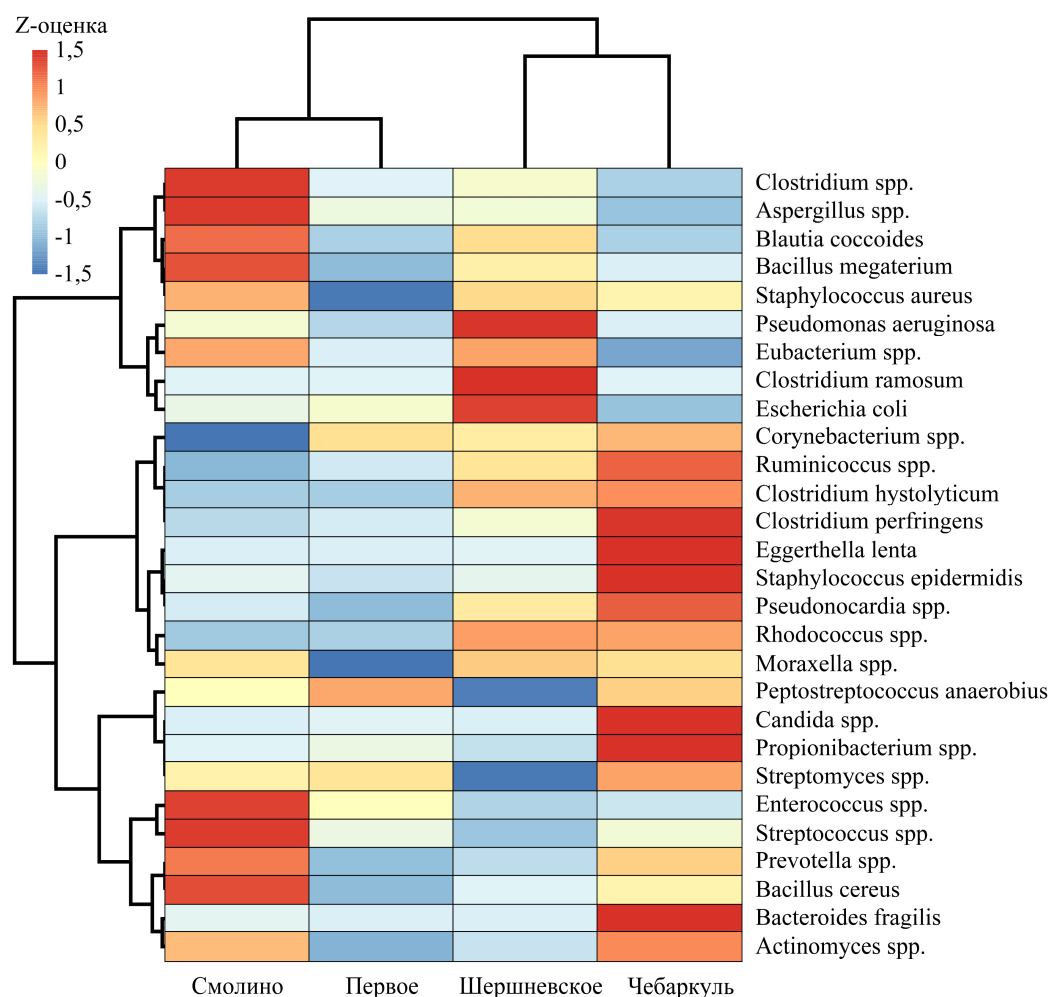


Рис. 3. Группировки водоёмов и микроорганизмов на кластерной тепловой карте.

Наибольшие различия в численности микроорганизмов были характерны для озера Чебаркуль, которое было расположено вне города Челябинска и обладало большим количеством микроорганизмов – биоремедиаторов: представителей родов *Bacillus*, *Clostridium* и *Actinomyces* (рис. 3). Так, различные виды *Bacillus* используют тяжелые металлы для образования спор, тем самым снижая концентрацию тяжелых металлов в воде водоёмов [48, 49]. *Bacillus* можно применять для борьбы с накоплением тяжелых металлов в аквакультуре [49]. Представители рода *Clostridium* увеличивают свою численность в водоёмах с большим количеством органических веществ [50], поскольку основная роль этих организмов в природе заключается в разложении органического материала на кислоты, спирты, CO₂, H₂ и минералы. Способность образовывать споры, устойчивые к различным стрессовым воздействиям, делает клостридии вездесущими биоремедиаторами. Большинство видов облигатно анаэробны, что ограничивает среду их обитания анаэробными областями или областями с низким содержанием кислорода. Растущие и делящиеся клостридии обычно не обнаруживаются в поверхностных слоях озёр и рек, однако, споры клостридий в них присутствуют с высокой вероятностью [51]. Представители рода *Actinomyces* считаются типичными обитателями почвенных и пресноводных сред обитания [52], которые могут разлагать органические полимеры [53–55]. такие как лигнин, или поглощать аминокислоты путем метаболизма N-содержащих ароматических полимеров, таких как хитин [54, 55].

Все перечисленные выше свойства микроорганизмов–биоремедиаторов позволяют им поддерживать на гомеостатическом уровне как аутохтонную микробиоту озера, так и биогеохимический круговорот в целом. Наличие указанных видов свидетельствует о потенциальной способности исследованных водоёмов к самоочищению.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, использованный в работе метод ГХМС ММ позволяет эффективно и быстро проводить одномоментную детекцию численности и структуры около 50 таксонов, в том числе и санитарно-показательных микроорганизмов, в пробах воды.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Челябинской области в рамках научного проекта № 20-44-740003.

Список литературы

1. Reed A. J. Microbial ecology of Lake Superior Bacteria and Archaea: An overview / A. J. Reed, R. E. Hicks // Aquatic Ecosystem Health & Management. – 2011. – Vol. 14(4). – P. 386–395 (doi: 10.1080/14634988.2011.630282).
2. Liu L. M. Response of the eukaryotic plankton community to the cyanobacterial biomass cycle over 6 years in two subtropical reservoirs / L. M. Liu, H. H. Chen, M. Liu, J. R. Yang, P. Xiao, D. M. Wilkinson, J. Yang // The ISME Journal. – 2019. – Vol. 13(9). – P. 2196–2208 (doi: 10.1038/s41396-019-0417-9).

3. Savvichev A. S. Sharp water column stratification with an extremely dense microbial population in a small meromictic lake, Trekhtzvetnoe / A. S. Savvichev, V. V. Babenko, O. N. Lunina, M. A. Letarova, D. I. Boldyreva, E. F. Veslopolova, N. A. Demidenko, N. M. Kokryatskaya, E. D. Krasnova, V. A. Gaisin, E. S. Kostryukova, V. M. Gorlenko, A. V. Letarov // *Environ. Microbiol.* – 2018. – Vol. 20(10). – P. 3784–3797 (doi: 10.1111/1462-2920.14384).
4. Sagova-Mareckova M. Expanding ecological assessment by integrating microorganisms into routine freshwater biomonitoring / M. Sagova-Mareckova, J. Boenigk, A. Bouchez, K. Cermakova, T. Chonova, T. Cordier, U. Eisendle, T. Elersek, S. Fazi, T. Fleituch, L. Frühe, M. Gajdosova, N. Graupner, A. Haegerbaeumer, A. M. Kelly, J. Kopecky, F. Leese, P. Nöges, S. Orlic, K. Panksep, T. Stoeck // *Water research.* – 2021. – Vol. 191. – P. 116767 (doi: 10.1016/j.watres.2020.116767).
5. Phulpoto I. Effect of natural microbiome and culturable biosurfactants-producing bacterial consortia of freshwater lake on petroleum-hydrocarbon degradation / I. Phulpoto, B. Hu, Y. Wang, F. Ndayisenga, J. Li, Z. Yu // *Science of The Total Environment.* – 2021. – Vol. 751. – P. 141720 (doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141720).
6. ГОСТ 18963-73 Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа. – Москва: Стандартинформ, 2008. – 20 с.
7. МУК 4.2.1884-04 Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов. Дата введения 2004–03–03. [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200039680> (дата обращения: 19.11.2021).
8. Струкова Е. Г. Определение микрoэкологического статуса и диагностика инфекций организма человека с использованием метода хромато-масс-спектрометрии / Е. Г. Струкова, А. А. Ефремов, А. А. Гонтова, Г. А. Осипов, Н. И. Сарматова // *Journal of Siberian Federal University. Chemistry.* – 2009. – Т. 4, вып. 2. – С. 351–358.
9. Douterelo I. Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems / I. Douterelo, J. B. Boxall, P. Deines, R. Sekar, K. Fish, C. Biggs // *Water Research.* – 2014. – Vol. 65. – P. 134–156 (doi: 10.1016/j.watres.2014.07.008).
10. Botes M. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water / M. Botes, M. de Kwaadsteniet, T. E. Cloete // *Anal Bioanal Chem.* – 2013. – Vol. 405(1). – P. 91–108 (doi: 10.1007/s00216-012-6399-3).
11. Ferone M. Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches / M. Ferone, A. Gowen, S. Fanning, AGM. Scannell // *Compr Rev Food Sci Food Saf.* – 2020. – Vol. 19(6). – P. 3106–3129 (doi: 10.1111/1541-4337.12618).
12. Zhang J. Microbial profiles of a drinking water resource based on different 16S rRNA V regions during a heavy cyanobacterial bloom in Lake Taihu, China / J. Zhang, C. Zhu, R. Guan, Z. Xiong, W. Zhang, J. Shi, Y. Sheng, B. Zhu, J. Tu, Q. Ge, T. Chen, Z. Lu // *Environ Sci Pollut Res Int.* – 2017. – Vol. 24(14). – P. 12796–12808 (doi: 10.1007/s11356-017-8693-2).
13. Osipov G. A. Comparative gas chromatography-mass spectrometry study of the composition of microbial chemical markers in feces / G. A. Osipov, N. B. Boiko, N. F. Fedosova, S. A. Kasikhina, K. V. Lyadov // *Microbial Ecology in Health and Disease.* – 2009. – Vol. 21(3–4). – P. 159–171 (doi: 10.3109/08910600903462657).
14. Ding S. Lipidomics of Environmental Microbial Communities. II: Characterization Using Molecular Networking and Information Theory / S. Ding, N. J. Bale, E. C. Hopmans, L. Villanueva, M. G. I. Arts, S. Schouten, J. S. Sinninghe Damsté // *Front Microbiol.* – 2021. – Vol. 12 (doi:10.3389/fmicb.2021.659315).
15. Осипов Г. А. Клиническое значение исследования микроорганизмов слизистой оболочки кишечника культурально-биохимическим и хромато-масс-спектрометрическим методами / Г. А. Осипов, А. И. Парфенов, Н. В. Верховцева, И. Н. Ручкина // *Эксперим. и клинич. гастроэнтерология.* – 2003. – №4. – С. 59–62.
16. Larsson L. Determination of microbial chemical markers by gas chromatography-mass spectrometry – potential for diagnosis and studies on metabolism in situ / L. Larsson // *APMIS.* – 1994. – Vol. 102(1–6). – P. 161–169 (doi: 10.1111/j.1699-0463.1994.tb04861.x).
17. Родионов Г. Г. Оценка пристеночной микробиоты кишечника здоровых людей методом газовой хромато-масс-спектрометрии / Г. Г. Родионов, И. И. Шантырь, Е. В. Светкина, Э. С. Сарьян,

- Т. В. Вавилова // Трансляционная медицина. – 2017. – Т. 4 – №6. – С. 34–42 (doi: 10.18705/2311-4495-2017-4-6-34-42).
18. Платонова А. Г. Хромато-масс-спектрометрическое исследование микробных жирных кислот в биологических жидкостях человека и их клиническая значимость / А. Г. Платонова, Г. А. Осипов, Н. Б. Бойко, Н. В. Кириллова, Г. Г. Родионов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – Т. 60, №12. – С. 46–55.
 19. Федосова Н. Ф. Новые подходы к анализу инфекционных, послеоперационных и посттравматических осложнений / Н. Ф. Федосова, К. В. Лядов, Г. А. Осипов // Инфекции в хирургии. – 2010. – Т.8, № 2. – С. 56–62.
 20. Малинина Н. В. Атопический дерматит у детей и микробиота кишечника. Исследование методом масс-спектрометрии микробных маркеров / Н. В. Малинина, Г. А. Осипов, Н. Б. Бойко // Педиатр. – 2010. – Т.1, №1. – С. М51.
 21. Филиппова Ю. Ю. Когнитивная ось старости: воспаление – микробиота тонкого кишечника / Ю. Ю. Филиппова, А. Л. Бурмистрова // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – №5. – С. 3–9.
 22. Бурмистрова А. Л. Микробный консорциум и окситоцин в социальном поведении детей с расстройствами аутистического спектра / А. Л. Бурмистрова, Ю. Ю. Филиппова, А. В. Тимофеева // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – №4. – С. 62–67.
 23. Dalavai V. Gas chromatography – mass spectrometric determination of fatty acid methyl esters of four marine cyanobacterial species / V. Dalavai, P. B. Gundala, J. Kannali, P. Charantheja, G. S. Kumari, P. Chinthala // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2016. – Vol. 7(5). – P. 1420.
 24. Шумилова Л. П. Изучение микробного сообщества городских почв методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии / Л. П. Шумилова, Н. Г. Куимова // Бюл. физ. и пат. дых. – 2013. – №50. – С. 121–125.
 25. Hammer Ø. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis / Ø. Hammer, D. A. T. Harper, P. D. Ryan // Palaeontologia Electronica. – 2001. – № 1. – P. 1–9.
 26. Nocerino J. Scout Version 1.0. User Guide Part I / J. Nocerino, A. Singh, R. Maichle, N. Armbya, A. K. Singh // Washington: U.S. Environmental Protection Agency. – 2008. – 244 p.
 27. FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization]. Statistical Aspects of Microbiological Criteria Related to Foods. A Risk Managers Guide. Microbiological Risk Assessment Series no 24. Rome. – 2016. – 120 p.
 28. Wilkinson L. The history of the cluster heat map / L. Wilkinson, M. Friendly // The American Statistician. – 2009. – Vol. 63(2). – P. 179–184 (doi: 10.1198/tas.2009.0033).
 29. Ким Д. О. Факторный, дискриминантный и кластерный анализ / Д. О. Ким, Ч. У. Мюллер, У. Р. Клекка [Пер. с англ. под ред. И.С. Енюкова]. – М. : Финансы и статистика, 1989. – 215 с.
 30. Kolde R. Package ‘pheatmap’: Pretty Heatmaps Version 1.0.12, 2018. [Электронный ресурс]. URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/pheatmap.pdf> (дата обращения: 19.11.2021).
 31. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Austria, Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2016. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.R-project.org> (дата обращения: 19.11.2021).
 32. Levine A. D. Collecting, exploring, and interpreting microbiological data associated with reclaimed water systems: a guidance manual / A. D. Levine, V. J. Harwood, G. A. Fox // Alexandria, VA: WateReuse Foundation. – 2009. – P. 76.
 33. Duarte A. S. R. The interpretation of quantitative microbial data: meeting the demands of quantitative microbiological risk assessment / A. S. R. Duarte // Denmark: National Food Institute. – 2013. – P. 158.
 34. Jarvis B. Statistical aspects of the microbiological examination of foods / B. Jarvis // Elsevier B. V. – 2016. – P. 306 (doi: 10.1016/C2015-0-00103-4).
 35. Wendelberger J. Non-detect data in environmental investigations / J. Wendelberger, K. Campbell // US Los Alamos National Lab. – 1994. – 12 p.
 36. Shoari N. Toward improved analysis of concentration data: embracing nondetects / N. Shoari, J. S. Dubé // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2018. – Vol. 37(3). – P. 643–656 (doi: 10.1002/etc.4046).

37. Shumway R. H. Statistical approaches to estimating mean water quality concentrations with detection limits / R. H. Shumway, R. S. Azari, M. Kayhanian // *Environ. Sci. Technol.* – 2002. – Vol. 36(15). – P. 3345–3353 (doi: 10.1021/es0111129).
38. Helsel D. R. Nondetects and data analysis: statistics for censored environmental data / D. R. Helsel // New York: John Wiley and Sons. – 2004. – 268 p.
39. Nocerino J. Scout 2008 Version 1.0. User Guide Part I / J. Nocerino, A. Singh, R. Maichle, N. Armbya, A. K. Singh // Washington: U.S. Environmental Protection Agency. – 2008. – 244 p.
40. Shin J. Genome Engineering of *Eubacterium limosum* Using Expanded Genetic Tools and the CRISPR-Cas9 System / J. Shin, S. Kang, Y. Song, S. Jin, J. S. Lee, J. K. Lee, D. R. Kim, S. C. Kim, S. Cho, B. K. Cho // *ACS syntheticbiology.* – 2019. – Vol. 8(9). – P. 2059–2068 (doi: 10.1021/acssynbio.9b00150).
41. Schuchmann K. Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria / K. Schuchmann, V. Müller // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2014. – Vol. 12(12). – P. 809–821 (doi: 10.1038/nrmicro3365).
42. Fast A. G. Stoichiometric and energetic analyses of non-photosynthetic CO₂-fixation pathways to support synthetic biology strategies for production of fuels and chemicals / A. G. Fast, E. T. Papoutsakis // *Curr. Opin. Chem. Eng.* – 2012. – Vol. 1(4). – P. 380–395 (doi: 10.1016/j.coche.2012.07.005).
43. Schuchmann K. Basic principles of bioconversions in anaerobic digestion and methanogenesis / K. Schuchmann, V. Müller [S. S. Sofer, O. R. Zaborsky, Eds.]. – US, Boston, Springer, 2014. – P. 277–296.
44. Kountz D. J. MtcB, a member of the MttB superfamily from the human gut acetogen *Eubacterium limosum*, is a cobalamin-dependent carnitine demethylase / D. J. Kountz, E. J. Behrman, L. Zhang, J. A. Krzycki // *The Journal of biological chemistry.* – 2020. – Vol. 295(34). – P. 11971–11981 (doi: 10.1074/jbc.ra120.012934).
45. Bunesova V. Mucin Cross-Feeding of Infant Bifidobacteria and *Eubacterium hallii* / V. Bunesova, C. Lacroix, C. Schwab // *Microbiol. Ecol.* – 2018. – Vol. 75(1). – P. 228–238 (doi: 10.1007/s00248-017-1037-4).
46. Hur H. Biotransformation of the isoflavonoids biochanin A, formononetin, and glycitein by *Eubacterium limosum* / H. Hur, F. Rafii // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2000. – Vol. 192(1). – P. 21–25 (doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09353.x).
47. Genthner B. R. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, an ethanol- and H₂-CO₂-utilizing species / B. R. Genthner, C. L. Davis, M. P. Bryant // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1981. – Vol. 42. – P. 12.
48. Zhao S. Bioremediation of reclaimed wastewater used as landscape water by using the denitrifying bacterium *Bacillus cereus* / S. Zhao, N. Hu, Z. Chen, B. Zhao, Y. Liang // *Bulletin of environmental contamination and toxicology.* – 2009. – Vol. 83(3). – P. 337–340 (doi: 10.1007/s00128-009-9684-x).
49. Hlordzi V. The use of *Bacillus* species in maintenance of water quality in aquaculture: A review / V. Hlordzi, F. K. A. Kuebutornye, G. Afriyie, E. D. Abarike, Y. Lu, S. Chi, M. A. Anokye // *Aquaculture Reports.* – 2020. – Vol. 18. – P. 100503 (doi: 10.1016/j.aqrep.2020.100503).
50. Cao X. Adaptive variations of sediment microbial communities and indication of fecal-associated bacteria to nutrients in a regulated urban river / X. Cao, Y. Wang, Y. Xu, G. Duan, M. Huang, J. Peng // *Water.* – 2020. – Vol. 12(5). – P. 1344 (doi: 10.3390/w12051344).
51. Rainey F. A. Genus *Clostridium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. / F. A. Rainey, B. J. Hollen, A. Small [P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer, W. B. Whitman, Eds.]. Springer: New York, NY, USA, 2009. – Vol. 3. – P. 738–828.
52. Warnecke F. Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages / F. Warnecke, R. Amann, J. Pernthaler // *Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 6. – P. 242–253 (doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00561.x).
53. Ghai R. Key roles for freshwater Actinobacteria revealed by deep metagenomic sequencing / R. Ghai, C. M. Mizuno, A. Picazo, A. Camacho, F. Rodriguez-Valera // *Mol. Ecol.* – 2014. – Vol. 23(24). – P. 6073–6090 (doi: 10.1111/mec.12985).
54. Salcher M. M. Spatiotemporal distribution and activity patterns of bacteria from three phylogenetic groups in an oligomesotrophic lake / M. M. Salcher, J. Pernthaler, T. Posch // *Limnol. Oceanogr.* – 2010. – Vol. 55(2). – P. 846–856 (doi: 10.4319/lo.2010.55.2.0846).

55. Eckert E. M. Rapid successions affect microbial N-acetyl-glucosamine uptake patterns during a lacustrine spring phytoplankton bloom / E. M. Eckert, Salcher, M. M. Posch, T. B. Eugster, J. Pernthaler // *Environ. Microbiol.* – 2012. – Vol. 14(3). – P. 794–806 (doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02639.x).

GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY OF MICROBIAL MARKERS METHOD POSSIBILITIES FOR ASSESSMENT OF THE SANITARY AND ECOLOGICAL STATE OF WATER BODIES

Filippova Yu. Yu., Nokhrin D. Yu., Devyatova E. V., Andreeva S. V.

*Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia
E-mail: andreeva_sv81@mail.ru*

Microorganisms are important indicators of the water bodies' pollution for drinking and recreational purpose. Currently, the detection of the sanitary and epidemiological state of water bodies is carried out using the classic bacteriological method, which has a number of disadvantages, such as duration and laboriousness of the study. As an alternative, the paper proposes the method of gas chromatography-mass spectrometry of microbial markers (GCMS MM). This method is based on the determination of specific fatty acids (FA), aldehydes, alcohols and sterols in the cell wall of microorganisms directly in the sample, without the extraction of pure cultures. GCMS MM allows the simultaneous detection and quantification of more than 50 genus/species in one sample. The advantages of the method are: high speed of obtaining the results (about 2.5 hours), and relatively low cost of equipment and reagents. To test the method, we estimated the abundance of several specimen of the water microbiota of 4 lakes in the Chelyabinsk region with different anthropogenic load. In each reservoir, samples were taken at 3 points from 3 levels (surface, middle, and bottom), taking into the account the requirements of asepsis. The concentration of the water samples was taken using membrane filter method. The extraction of lipid substances (including FAs of microorganisms) was carried out using acid methanolysis. Chromatographic separation and identification of the extracted compounds were performed on a gas chromatograph using a mass-selective detector "Maestro". To interpret the results and connect lipid markers with a specific microorganism, we used a program developed by G.A. Osipov. In statistical analysis, for all bacteria, the geometric mean of their concentration in each body of water with 95% confidence intervals (95 % CI) have been calculated. In the samples with censored observations of the "less than" type, the mean values of the logarithms were calculated by using the Kaplan–Meier method and 95 % CI for them, using the bootstrap method (percentile method, n=9999). The reservoirs were compared by concentration of microorganisms, using the Kruskal–Wallis rank test and post-hoc pairwise comparisons Dunn method. To visualize the relative values of the concentrations of microorganisms, as well as to simultaneously assess the similarity of water bodies and microorganisms, a cluster heat map was built. In this case, for grouping the rows and columns of the data matrix, hierarchical cluster analysis was used with the Spearman's correlation coefficients as the similarity measure and the Ward's method as the agglomerative algorithm. As a result of work using the GCMS MM method, 28 taxa of microorganisms belonging to 5

main phyla of bacteria (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*) and the kingdom of fungi were found in water samples from all lakes. 13 (46.4 %) taxa were identified up to the species level and 15 (53.6 %) up to the genus level. 9 species/genus of the specimen belonged to the sanitary and epidemiological indicators were used to determine the quality of drinking and recreational water. Among them are indicators of fresh fecal contamination (bacteria of the *Escherichia coli* group and *Enterococcus spp.*), indicators of long-standing fecal contamination (*Clostridium perfringens*) and opportunistic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Moraxella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*). Comparison of the microbiota community of lakes with different anthropogenic load (Smolino, Pervoe, Chebarkul lakes, and Shershnevsky reservoir) showed statistically significant differences in 17 taxa. Water bodies with a high anthropogenic load – lakes Pervoe and Smolino had a relatively low number of bacterial communities. On the contrary, Lake Chebarkul, located outside of the city Chelyabinsk and subject to low anthropogenic impact and is characterized by a high number of microorganisms, especially bioremediation bacteria: specimen of the genera *Bacillus*, *Clostridium* and *Actinomyces*. Thus, the results allow us to propose the GCMS MM method as an express method for assessing the sanitary and ecological state of water bodies. In addition, it can also be used to determine the abundance and structure of the microbiota community, which may reflect the level of anthropogenic load on a water body. Nevertheless, the method has two limitations: 1) relatively low sensitivity -1×10^4 CFU/ml; 2) due to the high diversity of microbial communities in natural environments, some lipid markers can be characteristic of several species / genus of bacteria at the same time.

Keywords: microbial communities, gas chromatography – mass spectrometry of microbial markers method sanitary and ecological indicators of water quality.

The research was funded by Russian Foundation for Basic Research (RFBR) and Chelyabinsk Region (project No. 20-44-740003).

References

1. Reed A. J. and Hicks R. E. Microbial ecology of Lake Superior Bacteria and Archaea: An overview, *Aquatic Ecosystem Health & Management*, **14**(4), 386 (2011). doi: 10.1080/14634988.2011.630282.
2. Liu L. M., Chen H. H., Liu M., Yang J. R., Xiao P., Wilkinson D. M. and Yang J. Response of the eukaryotic plankton community to the cyanobacterial biomass cycle over 6 years in two subtropical reservoirs, *ISME J*, **13**, 2196 (2019). doi: 10.1038/s41396-019-0417-9.
3. Savvichev A. S., Babenko V. V., Lunina O. N., Letarova M. A., Boldyreva D. I., Veslopolova E. F., Demidenko N. A., Kokryatskaya N. M., Krasnova E. D., Gaisin V. A., Kostryukova E. S., Gorlenko V. M. and Letarov A. V. Sharp water column stratification with an extremely dense microbial population in a small meromictic lake, Trekhtzvetnoe, *Environ. Microbiol*, **20**(10), 3787 (2018). doi: 10.1111/1462-2920.14384.
4. Sagova-Mareckova M., Boenigk J., Bouchez A., Cermakova K., Chonova T., Cordier T., Eisendle U., Elersek T., Fazi S., Fleituch T., Frühe L., Gajdosova M., Graupner N., Haegerbaeumer A., Kelly A. M., Kopecky J., Leese F., Nöges P., Orlic S., Panksep K. and Stoeck T. Expanding ecological assessment by integrating microorganisms into routine freshwater biomonitoring, *Water research*, **191**, 116767. (2021). doi: 10.1016/j.watres.2020.116767.

5. Phulpoto I., Hu B., Wang Y., Ndayisenga F., Li J. and Yu Z. Effect of natural microbiome and culturable biosurfactants-producing bacterial consortia of freshwater lake on petroleum-hydrocarbon degradation, *Science of The Total Environment*, **751**, 141720 (2021). doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141720.
6. GOST 18963-73 Drinking water. Methods of sanitary and bacteriological analysis, *Standartinform*, 20 (2008). (in Russ.).
7. MUK 4.2.1884-04 Sanitary-microbiological and sanitary-parasitological analysis of water of surface water bodies. Date of introduction 2004-03-03. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200039680> (Accessed November 19, 2021). (in Russ.).
8. Strukova E. G., Efremov A. A., Gontova A. A., Osipov G. A. and Sarmatova N. I. Determination of the microenvironmental status and diagnosis of human infections using chromatography-mass spectrometry method, *Journal of Siberian Federal University. Chemistry*, **4**(2), 351 (2009). (in Russ.).
9. Douterelo I., Boxall J. B., Deines P., Sekar R., Fish K. and Biggs C. Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems, *Water Research*, **65**, 134 (2014). doi: 10.1016/j.watres.2014.07.008.
10. Botes M., de Kwaadsteniet M. and Cloete T. E. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water, *Anal Bioanal Chem*, **405**(1), 91 (2013). doi: 10.1007/s00216-012-6399-3.
11. Ferone M., Gowen A., Fanning S. and Scannell A. G. M. Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches, *Compr Rev Food Sci Food Saf*, **19**(6), 3106 (2020). doi: 10.1111/1541-4337.12618.
12. Zhang J., Zhu C., Guan R., Xiong Z., Zhang W., Shi J., Sheng Y., Zhu B., Tu J., Ge Q., Chen T. and Lu Z. Microbial profiles of a drinking water resource based on different 16S rRNA V regions during a heavy cyanobacterial bloom in Lake Taihu, China, *Environ Sci Pollut Res Int*, **24**(14), 12796 (2017). doi: 10.1007/s11356-017-8693-2.
13. Osipov G. A., Boiko N. B., Fedosova N. F., Kasikhina S. A. and Lyadov K. V. Comparative gas chromatography-mass spectrometry study of the composition of microbial chemical markers in feces, *Microbial Ecology in Health and Disease*, **21**(3-4), 159 (2009). doi: 10.3109/08910600903462657.
14. Ding S., Bale N. J., Hopmans E. C., Villanueva L., Arts M. G. I., Schouten S. and Sinninghe Damsté J. S. Lipidomics of Environmental Microbial Communities. II: Characterization Using Molecular Networking and Information Theory, *Front Microbiol.*, **12**, (2021). doi:10.3389/fmicb.2021.659315.
15. Osipov G. A., Parfenov A. I., Verkhovtseva N. V. and Ruchkina I. N. Clinical significance of examination of intestinal mucosa microorganisms by culture-biochemical and chromato-mass spectrometric methods, *Experimental and Clinical Gastroenterology*, **4**, 59 (2003). (in Russ.).
16. Larsson L. Determination of microbial chemical markers by gas chromatography-mass spectrometry – potential for diagnosis and studies on metabolism in situ, *APMIS*, **102**(1-6), 161 (1994). doi: 10.1111/j.1699-0463.1994.tb04861.x.
17. Rodionov G. G., Shantyr I. I., Svetkina E. V., Saryan E. S. and Vavilova T. V. Evaluation of the wall intestinal microbiota of healthy people by gas chromatography - mass spectrometry method, *Translational Medicine*, **4**(6), 34 (2017) doi: 10.18705/2311-4495-2017-4-6-34-42. (in Russ.).
18. Platonova A. G., Osipov G. A., Boyko N. B., Kirillova N. V. and Rodionov G. G. Chromato-mass-spectrometric study of microbial fatty acids in human biological fluids and their clinical significance, *Clinical Laboratory Diagnostics*, **60**(12), 46 (2015). (in Russ.).
19. Fedosova N. F., Lyadov K. V. and Osipov G. A. New approaches to the analysis of infectious, postoperative and posttraumatic complications, *Infections in Surgery*, **8**(2), 56 (2010).
20. Malinina N. V., Osipov G. A. and Boyko N. B. Atopic dermatitis in children and gut microbiota. A study by mass spectrometry of microbial markers, *Pediatr*, **1**(1), M51 (2010). (in Russ.).
21. Filippova Y. Y. and Burmistrova A. L. Cognitive axis of old age: inflammation - small intestine microbiota, *Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology*, **5**, 3 (2017). (in Russ.).
22. Burmistrova A. L. Filippova Y. Y. and Timofeeva A. V. Microbial consortium and oxytocin in the social behavior of children with autism spectrum disorders, *Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology*, **4**, 62, (2018). (in Russ.).
23. Dalavai V., Gundala P. B., Kannali J., Charantheja P., Kumari G. S. and Chinthala P. Gas chromatography – mass spectrometric determination of fatty acid methyl esters of four marine cyanobacterial species, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, **7**(5), 1420 (2016).

24. Shumilova L. P. and Kuimova N. G. Study of the microbial community of urban soils by gas chromatography-mass spectrometry, *Bulletin of physiology and pathology of respiration*, **50**, 121 (2013). (in Russ.).
25. Hammer Ø., Harper D. A. T and Ryan P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis, *Palaeontologia Electronica*, **1**, 1 (2001).
26. Nocerino J., Singh A., Maichle R., Armbya N. and Singh A. K. Scout Version 1.0. User Guide Part I, p. 244 (U.S. Environmental Protection Agency, Washington, 2008).
27. FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. *Statistical Aspects of Microbiological Criteria Related to Foods. A Risk Managers Guide. Microbiological Risk Assessment Series, no 24*. Rome, 120 (2016).
28. Wilkinson L. and Friendly M. The history of the cluster heat map, *The American Statistician*, **63**(2), 179 (2009). doi: 10.1198/tas.2009.0033.
29. Kim J.-O., Mueller C. W. and Klekka W. R. *Factor, Discriminant and Cluster Analysis* [Russian translation], p. 215 (Finance and Statistics, Moscow, 1989). (in Russ.).
30. Kolde R. Package 'pheatmap': Pretty Heatmaps Version 1.0.12, (2018). URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/pheatmap.pdf> (Accessed November 19, 2021).
31. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Austria, Vienna: R Foundation for Statistical Computing, (2016). URL: <https://www.R-project.org> (Accessed November 19, 2021).
32. Levine A. D., Harwood V. J. and Fox G. A. Collecting, exploring, and interpreting microbiological data associated with reclaimed water systems: a guidance manual, *Alexandria, VA: WaterReuse Foundation*, 76 (2009).
33. Duarte A. S. R. The interpretation of quantitative microbial data: meeting the demands of quantitative microbiological risk assessment, *Denmark: National Food Institute*, 158 (2013).
34. Jarvis B. Statistical aspects of the microbiological examination of foods, *Elsevier B.V.*, 306 (2016). doi: 10.1016/C2015-0-00103-4.
35. Wendelberger J. and Campbell K. Non-detect data in environmental investigations, *US Los Alamos National Lab*, 12 (1994).
36. Shoari N. and Dubé J.-S. Toward improved analysis of concentration data: embracing nondetects, *Environ., Toxicol. and Chem.*, **37**(3), 643 (2018). doi: 10.1002/etc.4046.
37. Shumway R. H., Azari R. S. and Kayhanian M. Statistical approaches to estimating mean water quality concentrations with detection limits, *Environ. Sci. Technol.*, **36**(15), 3345 (2002). doi: 10.1021/es0111129.
38. Helsel D. R., *Nondetects and data analysis: statistics for censored environmental data*, p. 268 (John Wiley and Sons, New York, 2004).
39. Nocerino J., Singh A., Maichle R., Armbya N. and Singh A. K. *Scout 2008 Version 1.0. User Guide Part I*, p. 244 (U.S. Environmental Protection Agency, Washington, 2008).
40. Shin J., Kang S., Song Y., Jin S., Lee J. S., Lee J. K., Kim D. R., Kim S. C., Cho S. and Cho B. K. Genome Engineering of *Eubacterium limosum* Using Expanded Genetic Tools and the CRISPR-Cas9 System, *ACS synthetic biology*, **8**(9), 2059 (2019). doi: 10.1021/acssynbio.9b00150.
41. Schuchmann K. and Müller V. Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria, *Nat. Rev. Microbiol.* **12**(12), 809 (2014). doi: 10.1038/nrmicro3365.
42. Fast A. G. and Papoutsakis E. T. Stoichiometric and energetic analyses of non-photosynthetic CO₂-fixation pathways to support synthetic biology strategies for production of fuels and chemicals, *Curr. Opin. Chem. Eng.*, **1**(4), 380 (2012). doi: 10.1016/j.coche.2012.07.005.
43. Schuchmann K. and Müller V. *Basic principles of bioconversions in anaerobic digestion and methanogenesis*, [S. S. Sofer, O. R. Zaborsky, Eds.], p. 277 (Springer, Boston, 2014).
44. Kountz D. J., Behrman E. J., Zhang L. and Krzycki J. A. MtcB, a member of the MttB superfamily from the human gut acetogen *Eubacterium limosum*, is a cobalamin-dependent carnitine demethylase, *The Journal of biological chemistry*, **295**(34), 11971 (2020). doi: 10.1074/jbc.ra120.012934.
45. Bunesova V., Lacroix C. and Schwab C. Mucin Cross-Feeding of Infant Bifidobacteria and *Eubacterium hallii*, *Microbial ecology*, **75**(1), 228 (2018). doi: 10.1007/s00248-017-1037-4.
46. Hur H. and Ruffin F. Biotransformation of the isoflavonoids biochanin A, formononetin and glycitein by *Eubacterium limosum*, *FEMS Microbiol. Lett.* **192**(1), 21 (2000). doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09353.x

47. Genthner B. R., Davis C. L. and Bryant M. P. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, amethanol- and H₂-CO₂-utilizing species, *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 12 (1981).
48. Zhao S., Hu N., Chen Z., Zhao B. and Liang Y. Bioremediation of reclaimed wastewater used as landscape water by using the denitrifying bacterium *Bacillus cereus*, *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, **83**(3), 337 (2009). doi: 10.1007/s00128-009-9684-x.
49. Hlordzi V., Kuebutornye F. K. A., Afriyie G., Abarike E. D., Lu Y., Chi S. and Anokyewaa M. A. The use of *Bacillus* species in maintenance of water quality in aquaculture: A review, *Aquaculture Reports*, **18**, 100503 (2020). doi: 10.1016/j.aqrep.2020.100503.
50. Cao X., Wang, Y., Xu Y., Duan G., Huang M. and Peng J. Adaptive variations of sediment microbial communities and indication of fecal-associated bacteria to nutrients in a regulated urban river, *Water*, **12**(5), 1344 (2020). doi: 10.3390/w12051344.
51. Rainey F. A., Hollen B. J. and Small A. *Genus Clostridium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., [De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K.-H., Whitman W.B. Eds.], p. 738 (Springer, New York, 2009).
52. Warnecke F., Amann R. and Pernthaler J. Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages, *Environ. Microbiol.*, **6**, 242 (2004). doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00561.x.
53. Ghai R., Mizuno C. M., Picazo A., Camacho A. and Rodriguez-Valera F. Key roles for freshwater Actinobacteria revealed by deep metagenomic sequencing, *Mol. Ecol.*, **23**(24), 6073 (2014). doi: 10.1111/mec.12985.
54. Salcher M. M., Pernthaler J. and Posch T. Spatiotemporal distribution and activity patterns of bacteria from three phylogenetic groups in an oligomesotrophic lake, *Limnol. Oceanogr.*, **55**(2), 846 (2010). doi: 10.4319/lo.2010.55.2.0846.
55. Eckert E. M., Salcher M. M., Posch T., Eugster B. and Pernthaler J. Rapid successions affect microbial N-acetyl-glucosamine uptake patterns during a lacustrine spring phytoplankton bloom, *Environ. Microbiol.* **14**(3), 794 (2012). doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02639.x.