

*На правах рукописи*

**Гуреева Мария Валерьевна**

**БИОРАЗНООБРАЗИЕ НОВЫХ НИТЧАТЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ  
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *VEGGIATOACEAE* И АНАЛИЗ ГЕНОМОВ  
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА  
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДОВ *VEGGIATOA*, *THIOFLEXITHRIX* И  
*AZOSPIRILLUM***

**Специальность 03.02.03 – микробиология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата биологических наук**

**Москва – 2019**

Работа выполнялась на кафедре биохимии и физиологии клетки медико-биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет».

**Научный руководитель:** **Грабович Маргарита Юрьевна,**  
доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии и физиологии клетки Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет»

**Официальные оппоненты:** **Карначук Ольга Викторовна,**  
доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой физиологии растений и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

**Намсараев Зоригто Баирович,**  
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт" (НИЦ "Курчатовский институт")

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук

Защита состоится 22 мая 2019 г. в 11-00 на заседании диссертационного совета Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке ИНМИ РАН по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 года

**Ученый секретарь  
диссертационного совета**

доктор биологических наук  
Хижняк Татьяна Владимировна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Бесцветные серобактерии – уникальная группа микроорганизмов. Представители семейства *Beggiatoaceae* в большинстве случаев относятся к некультивируемым формам, характеризуются впечатляющим морфологическим разнообразием – нити; пучки нитей, окруженные общей слизистой оболочкой; нити, растущие в виде розеток; одиночные клетки (Salman et al., 2011, 2013). Размер клеток может варьировать у разных представителей от 1 до 200, а порой до 750 мкм. Они обитают в водных экосистемах, в противоположно направленных градиентах сероводорода и кислорода. Способны использовать восстановленные соединения серы в качестве донора электронов для энергетического метаболизма, а их окисление при этом сопровождается накоплением элементной серы в клетках (Winogradsky, 1887; Nelson and Jannasch, 1983). Окисление восстановленных соединений серы может быть сопряжено с восстановлением кислорода или нитратов.

Бесцветные серобактерии образуют мощные обрастания на дне водоемов в местах выхода сероводорода - токсичного газа, который в больших концентрациях вызывает отравление промысловых рыб, ингибирует дыхательную цепь, препятствуя окислительному фосфорилированию. Сероокисляющие бактерии могут быть естественными фильтрами, которые метаболизируют токсичные соединения серы и препятствуют поступлению сероводорода в вышележащие слои.

Таксономия сероокисляющих бактерий остается слаборазработанной. Об этом свидетельствует постоянно меняющаяся классификация данной группы. Большинство бесцветных серобактерий, относящихся к классу гаммапротеобактерии, традиционно классифицировали в три семейства по морфологическим признакам: (1) *Beggiatoaceae* (Leadbetter 1974; Strohl 1989); (2) *Leucotrichaceae* (Buchanan 1957; Brock 1974); и (3) *Achromatiaceae* (Van Niel 1948). В последнем издании определителя Берги, посвященном протеобактериям, большинство сероокисляющих гаммапротеобактерий были отнесены к семейству *Thiotrichaceae* (Garrity et al., 2005). В 2011 году была опубликована статья Salman et al., в которой указывалось, что эта реклассификация не основывается на филогенетических данных и противоречит правилу 51b Бактериологического кодекса (Lapage et al., 1992). Salman с соавторами предложили вернуть семейство *Beggiatoaceae* и включить в него роды, наиболее близкие к *Beggiatoa*, а также добавить в состав семейства девять новых видов входящих в семь новых родов со статусом *Candidatus*.

Развитие технологий геномного секвенирования и получение информации о геномах микроорганизмов существенно расширяет возможности изучения их таксономии и метаболизма. В настоящее время предложено построение новой таксономии прокариот на основе построения филогенетических деревьев по конкатенированным последовательностям 120 белков (Parks et al., 2018). Согласно ей, семейство *Beggiatoaceae* следует относить к отдельному порядку *Beggiatoales*. В состав семейства планируется включить рода *Beggiatoa*, *Marithrix*, *Thioflexithrix* и *Thioploca* (<http://gtdb.ecogenomic.org/tree>). Итак, открытия последних десятилетий показывают, что наши знания о таксономии бесцветных серобактерий, в частности семейства *Beggiatoaceae*, ставят много вопросов, которые пока остаются без ответов.

За последние 8-10 лет были существенно расширены знания о биохимических деталях различных путей окисления восстановленных соединений серы. Кроме того, стало доступно значительное количество дополнительных геномных последовательностей для серобактерий, что позволяет получать дополнительную информацию по механизмам превращения соединений серы и эволюции генов, ответственных за данные процессы.

Так в последнее десятилетие для многих прокариот, которые ранее считались типичными гетеротрофами, была показана способность к литотрофному росту за счет окисления восстановленных соединений серы, а при окислении сероводорода в клетках показано отложение элементной серы, что характерно для бесцветных серобактерий: *Azospirillum thiophilum* (Фролов и др., 2013), *Leucothrix mucor* (Grabovich et al., 1999), *Sphaerotilus natans* subsp. *sulfidivorans* (Gridneva et al., 2011). Несмотря на достижения в изучении биологии бесцветных серобактерий, все еще остаётся много пробелов в знаниях об их метаболическом потенциале.

В данной работе проводится таксономическое описание двух новых сероокисляющих бактерий из семейства *Beggiatoaceae* – *Thioflexithrix psekuensis* gen. nov., sp. nov. и *Beggiatoa leptomitiformis* sp. nov., а также анализ геномов для выявления метаболического разнообразия представителей родов *Beggiatoa*, *Thioflexithrix* и *Azospirillum*.

## **Цель и задачи исследования**

**Цель работы** - таксономическое описание двух новых представителей семейства *Beggiatoaceae* и анализ геномов для выявления метаболического разнообразия литотрофных сероокисляющих бактерий из семейства *Beggiatoaceae* и *Azospirillum thiophilum*.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести полифазный анализ и таксономическое описание двух новых представителей семейства *Beggiatoaceae*.
2. Осуществить биоинформатический анализ геномов *Thioflexithrix psekuensis* D3<sup>T</sup>, *Beggiatoa leptomitiformis* D-402<sup>T</sup> и *Azospirillum thiophilum* BV-S<sup>T</sup>.
3. Выявить в геномах *T. psekuensis*, *B. leptomitiformis* и *A. thiophilum* гены, кодирующие ферменты диссимиляционных путей превращения восстановленных соединений серы и молекулярного водорода; экспериментально подтвердить способность к литотрофии.
4. Осуществить поиск в геномах генов, кодирующих ферменты автотрофного пути ассимиляции CO<sub>2</sub>, и экспериментальную проверку способности к автотрофному росту при разных кислородных режимах.
5. Выявить в геномах гены, кодирующие ферменты, участвующие в использовании C<sub>1</sub>-соединений в качестве источников углерода и энергии при метилотрофном росте; установить пути превращения метанола и экспериментально проверить полученные геномные данные.
6. Установить способность к ассимиляции N<sub>2</sub> и тип дыхательного метаболизма.

## **Научная новизна и значимость работы**

Расширены представления о таксономическом разнообразии нитчатых пресноводных серобактерий семейства *Beggiatoaceae*. До наших исследований

семейство *Beggiatoaceae* содержало лишь один валидно описанный вид – *Beggiatoa alba*. В ходе данной работы были описаны два новых таксона в составе семейства *Beggiatoaceae* (новый род и два новых вида): *Beggiatoa leptomitiformis* sp. nov. и *Thioflexithrix psekupsensis* gen. nov., sp. nov.

Получены полные геномные последовательности *B. leptomitiformis* (NZ\_CP012373.1), *Azospirillum thiophilum* (NZ\_CP012401.1-NZ\_CP012408.1) и драфт-геном *T. psekupsensis* (NZ\_MSLT00000000.1). Анализ геномов и экспериментальные данные позволили выявить метаболическое разнообразие представителей родов *Beggiatoa*, *Thioflexithrix* и *Azospirillum*. Выявлены метаболические пути диссимиляционного превращения соединений серы,  $H_2$ , метанола, а также путь ассимиляции  $CO_2$  и  $N_2$ .

Впервые показана способность к хемолитоавтотрофному росту для пресноводных представителей семейства *Beggiatoaceae*. Все исследованные бактерии способны к автотрофному росту за счет функционирования цикла Кальвина-Бенсона-Бассама. Выявлен тип рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксылазы: РБФК у *T. psekupsensis* D3 относится к форме IAq, у *B. leptomitiformis* D-402 – к форме IC, а у *A. thiophilum* BV-S в геноме закодированы два типа РБФК: IC и IV.

Впервые показана способность к метилотрофному росту у представителя рода *Azospirillum* - *A. thiophilum*, выявлен путь превращения метанола (через тетрагидрометаноптериновый путь) и впервые показано, что ассимиляция  $C_1$ -соединений ( $CO_2$ ) для анаболизма при метилотрофном росте у *A. thiophilum* и *B. leptomitiformis* осуществляется через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама.

### **Практическая значимость**

Существенно расширен состав семейства *Beggiatoaceae*. Также расширены представления о метаболическом потенциале представителей семейства *Beggiatoaceae* и рода *Azospirillum*. Полученные данные позволяют скорректировать область применения этих организмов в биотехнологических процессах.

Исследованные штаммы бактерий могут использоваться в качестве биофильтра для очистки сточных вод от токсичных соединений серы и метанола.

Синтезируемые *T. psekupsensis* экзополисахариды (гликан) могут быть использованы в фармацевтике в качестве основ для изготовления лекарственных препаратов или в пищевой промышленности в качестве стабилизаторов или загустителей.

Полученные в работе результаты могут быть использованы для чтения курсов лекций по микробиологии в высших учебных заведениях, в справочных изданиях по микробиологии.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации доложены и обсуждены на международных и российских конференциях и симпозиумах: 1) 10<sup>th</sup> International congress on extremophiles, Saint-Petersburg, Russia, 2014; 2) 19-я международная пушинская школа-конференция молодых ученых "Биология - наука XXI века", Пушино, Россия, 2015; 3) 5-й Всероссийский симпозиум с международным участием «Автотрофные микроорганизмы», Москва, Россия, 2015; 4) VIII Всероссийская конференция молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей

средой», Саратов, Россия, 2016; 5) 7th FEMS Congress of European microbiologists, Valencia, Spain, 2017; 6) 1-й Российский микробиологический конгресс, Пущино, Россия, 2017; 7) 5th International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism, Vienna, Austria, 2018.

## Публикации

Материалы диссертации содержатся в 19 печатных работах: 10 экспериментальных статьях и 9 тезисах.

## Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложения.

Работа изложена на 165 страницах, включает 21 таблицу, 43 рисунка, список литературы из 274 наименований, из них 24 на русском и 250 на английском языке.

## Место проведения работы и благодарности

Работа была выполнена на кафедре биохимии и физиологии клетки Воронежского государственного университета.

Автор выражает глубокую признательность к.б.н. Белоусовой Е.В. за помощь в выделении чистой культуры *Thioflexithrix pseкупsensis* D3, Фоменкову А.И. за помощь в получении геномных последовательностей, Тарлачкову С.В. за помощь в анализе геномов, Новикову А.А. и Копицыну Д.С. за помощь в хемотаксономическом анализе, к.б.н. Федоненко Ю.П. и Евстигнеевой С.С. за помощь в исследовании состава экзополисахаридов, д.х.н. Кузнецову В.А. за помощь в получении ЯМР-спектра, д.б.н. Дубининой Г.А. за помощь и консультации на всех этапах работы.

Работа была выполнена при финансировании в рамках грантов РФФИ № 15-04-03749, 16-34-01097, 18-04-00556.

Автор выражает особую благодарность д.б.н. Грабович М.Ю. за помощь в формулировании положений диссертации, полезные советы и поддержку на всех этапах работы.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Объекты и методы исследования

**Объектами исследования** были штаммы бесцветных серобактерий: D3<sup>T</sup> (КСТС 62399, UNIQEM U981), *Beggiatoa* sp. D-402<sup>T</sup> (DSM-14946, UNIQEM U 779), *Beggiatoa alba* B18LD (ATCC 33555), *Beggiatoa alba* B15LD (DSM-1416), *Azospirillum thiophilum* BV-S<sup>T</sup> (DSM-21654, VKM B-2513).

**Состав питательных сред** (г · л<sup>-1</sup> дистиллированной воды). Для D3: верхний слой: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.15, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0.075, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O – 0.05, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0.1, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O – 1.5, NaHCO<sub>3</sub> – 0.5; агар – 0.5; нижний слой: агар – 15, Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O – 0.6; для штаммов *Beggiatoa*: NaNO<sub>3</sub> – 0,62; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,125; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O – 0,03; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,5; KCl – 0,125; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – 0,05; для BV-S: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 1,0; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O – 0,03; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 1,0; Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O – 1; сукцинат натрия – 1,0; пептон – 2,0. Перед посевом в среды вносили набор витаминов и микроэлементов (Pfennig, Lippert, 1966); pH среды доводили до значения 7,2 – 7,5.

**Изучение фенотипических, хемотаксономических свойств** чистых культур бесцветных серобактерий проводили с помощью стандартных методов, используемых в микробиологической практике.

**Получение ферментных препаратов.** Суспензию клеток, клеточные экстракты (гомогенат), супернатант (цитоплазматическую фракцию) получали как описано ранее (Грабович и др., 1998; Grabovich et al, 1999). Белок в клеточных экстрактах определяли методом Лоури (Lowry et al., 1951).

**Методы определения активности ферментов.** Активность ферментов определяли в супернатанте разрушенных клеток из двухсуточной культуры в середине фазы экспоненциального роста. Измерение активности проводили спектрофотометрическими методами, как описано ранее (Грабович и др., 1998).

**Анализ неорганических соединений серы.** Раздельное определение  $S_2O_3^{2-}$ ,  $S_4O_6^{2-}$ ,  $S_3O_6^{2-}$  при их совместном присутствии в среде проводили методом раздельного йодометрического титрования (Резников и др., 1970). Содержание  $SO_4^{2-}$  определяли хлоранилатным методом (Уильямс, 1982). Элементную серу определяли по методу Морриса (Morris et al., 1948) колориметрически на СФ–2000.

**Выделение ДНК** из культуры BV-S<sup>T</sup> осуществлялось с использованием стандартного протокола фенол-хлороформной экстракции, из культуры D-402<sup>T</sup> - по методу Мармура (Marmur, 1961), из культуры D3<sup>T</sup> - с использованием коммерческого набора QIAGEN (США) с модификациями. Качество проб оценивалось путем электрофореза в 1% агарозном геле в TBE буфере, концентрация ДНК определялась при помощи спектрофотометра ND-1000 (NanoDrop Technologies, США).

**Геномы** секвенировали на коммерческой основе в компании New England Biolabs с использованием платформы секвенирования Pacific Biosciences RSII.

**Биоинформатический анализ геномов** был выполнен с использованием серверов RAST (Aziz et al., 2008) и KAAS (Moriya et al., 2007) с параметрами по умолчанию. Дополнительная аннотация некоторых генов проводилась вручную, при помощи BLAST (Altschul et al., 1990) с использованием неизбыточной белковой базы данных. Парное выравнивание последовательностей проводили с помощью алгоритма выравнивания Нидлмана–Вунша (Needleman–Wunsch) ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)). Круговые карты хромосом были сделаны с помощью DNAPlotter (Carver et al., 2009)

**Филогенетический анализ.** Последовательности были выровнены с использованием MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Выбор наилучшей модели замен осуществлялся в программе MEGA X (Kumar et al., 2018). Филогенетические деревья были реконструированы в той же программе с использованием методов Neighbour-Joining и Maximum-Likelihood (Felsenstein, 1985; Saitou and Nei, 1987). Статистическая оценка результатов кластеризации проводилась с помощью “bootstrap” – анализа 1000 альтернативных деревьев.

**Выделение РНК** осуществлялось с помощью реагента ExtractRNA (Evrogen, Россия) по протоколу производителя. Качество РНК оценивали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с 2,2М формальдегида. Концентрацию РНК измеряли с Qubit R RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) на флюориметре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, USA). 1000 нг РНК затем были обратно

транскрибированы на приборе Eppendorf Mastercycler Personal с использованием M-MulV (SybEnzyme, Russia) согласно протоколу производителя.

**Количественную ПЦР** проводили с использованием SYBR Green I на Bio-Rad CFX96TM Real-Time System (Bio-Rad, USA). Чтобы найти оптимальную для амплификации температуру, был применен температурный градиент. Полученная программа включала начальную денатурацию при 95° С в течение 3 мин; а затем 39 циклов денатурации 20 с при 95° С, 20-секундный отжиг праймера при 57° - 60° С и 30 секунд элонгации при 72° С. **Праймеры**, используемые в работе, подбирали в PrimerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Для **определения концентрации полисахаридов** бактерии культивировали в микроаэробных условиях. Углеводы определяли фенольным методом на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 488 нм (Герхард, 1984)

**Выделение экзополисахаридов и определение их моносахаридного состава** осуществляли как описано ранее (Орлова и др., 2015).

**Спектры ЯМР <sup>1</sup>Н** зарегистрированы на приборе Bruker Advance DPX300 (Германия) в D<sub>2</sub>O при 30 °С. В качестве стандарта использованы сигналы остаточных протонов растворителя в спектрах ЯМР <sup>1</sup>Н.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Нитчатые сероокисляющие бактерии

#### *Thioflexithrix psekupensis* gen. nov., sp.nov.

**Выделение чистой культуры.** Штамм D3 был выделен из образца, собранного из серного мата в микроаэробной зоне термального сульфидного источника в Горячем Ключе, Краснодарский край, Россия (N44 ° 38 'E39 ° 08') в августе 2012 года (рис. 1 А).

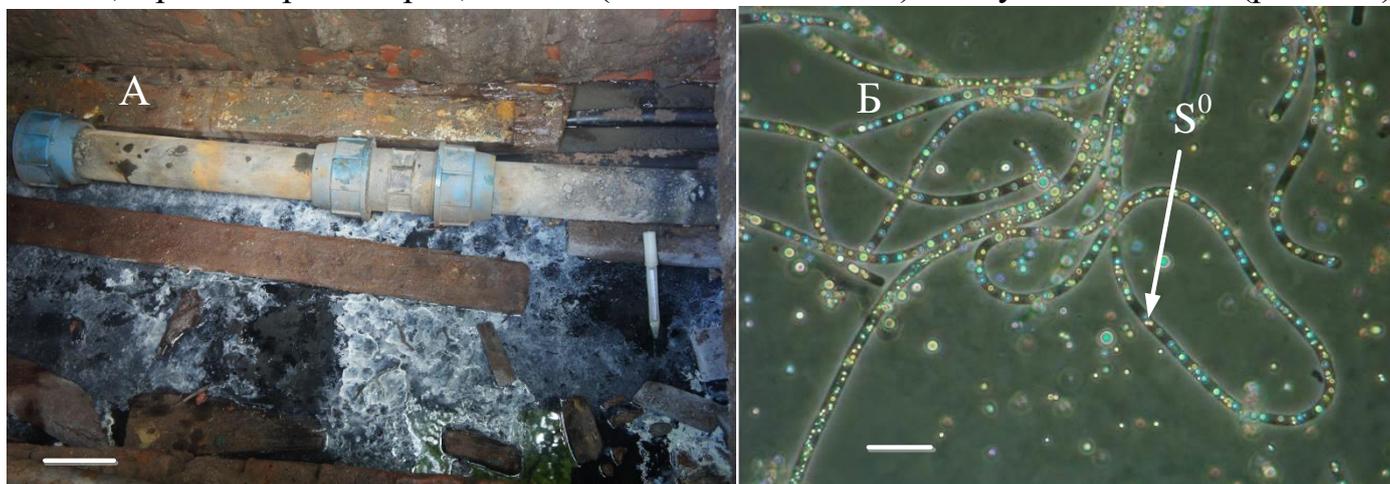


Рис. 1. А - сульфидный источник в городе Горячий Ключ Краснодарского края, из которого была выделена *T. psekupensis* D3. Масштаб, 10 см. Б - Микрофотография *T. psekupensis* D3. Масштаб, 5 мкм.

При выделении чистой культуры использовали способность нитей к скольжению по твердому субстрату.

**Фенотипические и хемотаксономические характеристики.** Основные дифференциальные характеристики штамма D3 и доступных на сегодняшний день в чистых культурах типовых штаммов пресноводных *Beggiatoa* перечислены в таблице 1.

Таблица 1. Черты, характеризующие штамм D3<sup>T</sup>, и два типовых штамма пресноводных *Beggiatoa*. 1, *Thioflexithrix pseukupensis* D3<sup>T</sup>; 2, *Beggiatoa leptomitiformis* D-402<sup>T</sup>; 3, *Beggiatoa alba* ATCC 33555<sup>T</sup>.  
н.о. – не определяли.

Характеристики	1	2	3
Диаметр клетки / длина клетки (максимальное значение), мкм	2.4-2.7/3.4-3.9	1.5–2.5 (3.0)	3.0–3.5 (5.0)
Длина нитей (мкм)	200	50–200	60–120
Пределы (и оптимум) температуры, °С	10 – 46 (32)	8–35 (28)	0–38
Пределы (и оптимум) pH	6.8 – 7.6 (7.2)	6.0–8.2 (7.5–7.8)	7.0–7.3 (7.2–7.3)
Максимальная концентрация NaCl для роста	2 %	0.3 %	1 %
Г+Ц состав ДНК (мол. %)	42.1	42.1	41.1
Восстановление S <sup>0</sup> или S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> до H <sub>2</sub> S	-	+	+
Используемые акцепторы электронов:			
Фумарат	+	-	-
ДМСО	+	-	-
O <sub>2</sub>	+*	+	+
Гидролиз крахмала	-	+	-
Используемые доноры электронов:			
H <sub>2</sub>	+	+	-
CS <sub>2</sub>	-	-	н.о.
S <sup>0</sup>	-	-	н.о.
S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup>	-	+	-
Присутствие и форма РБФК	+, IAq	+, IC	+, IC
Источники углерода:			
<b>Органические кислоты:</b> Ацетат, сукцинат, малат, лактат, пируват, аконитат, оксалоацетат	-	+	+
Характеристики	1	2	3
Фумарат	-	-	+
Цитрат, изоцитрат, глиоксилат, гликолат	-	н.о.	-
Формиат	-	+	-
<b>Спирты:</b> Метанол, этанол, бутанол	-	+	+
<b>Углеводы:</b> Глюкоза, галактоза, арабиноза, раффиноза, сахароза, мальтоза, лактоза, сорбоза	-	+	-
<b>Аминокислоты:</b> Глутамат, аспартат	-	н.о.	-
Серин, аспарагин	-	+	-
Триптофан, аланин, гистидин, фенилаланин	-	+	+
<b>Полимерные органические соединения:</b> Пептон, дрожжевой экстракт	-	+	+
Автотрофный рост	+	+	-
Гетеротрофный рост	-	+	+
Метилотрофный рост	-	+	+
Присутствие генов, кодирующих комплекс rDSR	<i>DsrABEFHCMLJ</i> <i>OPNR</i>	<i>DsrEFHCMKJ</i>	<i>DsrEFHCMKJ</i>
Доминирующие жирные кислоты	C <sub>18:1 ω7</sub> (37.6 %), C <sub>16:0</sub> (34.7 %) and C <sub>16:1 ω7</sub> (27.7 %)	C <sub>18:1 ω7</sub> (40.9 %), C <sub>16:0</sub> (32.9 %) and C <sub>16:1 ω7</sub> (21.7 %)	C <sub>16:1</sub> (25.4 %), C <sub>16:0</sub> (16.2 %), C <sub>18:1</sub> (53.3 %)**
Хиноны	UQ <sub>6</sub>	UQ <sub>6</sub>	н.о.

\* только в микроаэробных условиях; \*\* данные для *B. alba* B15LD (Dubinina et al., 2017)

**Филогения штамма D3.** Штамм D3 формирует на дереве отдельную филогенетическую ветвь, кластеризующуюся с морскими представителями *Beggiatoa* (рис. 2).

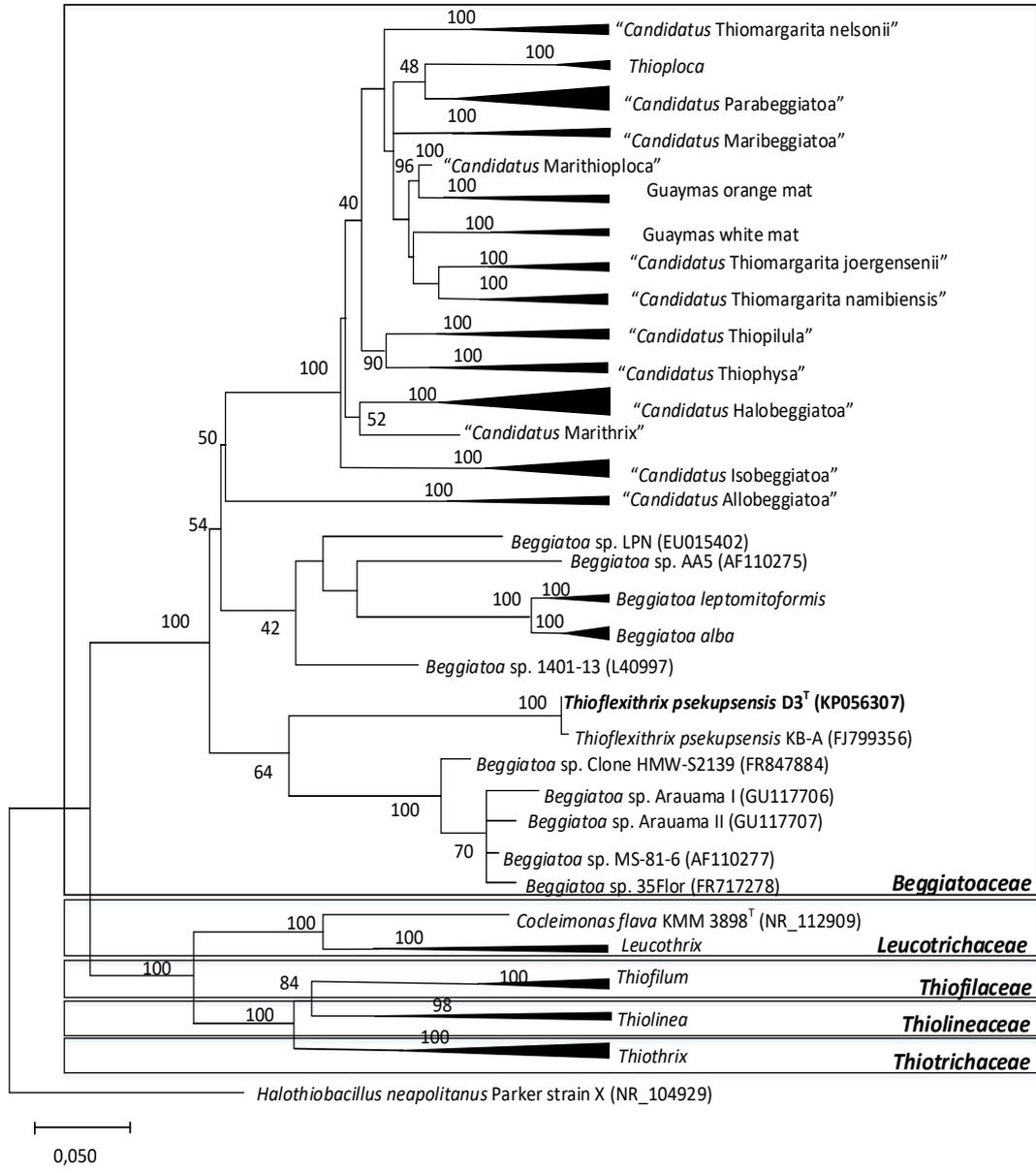


Рис. 2. Филогенетическое дерево, сконструированное на основании нуклеотидных последовательностей 16S рРНК методом Maximum-Likelihood, демонстрирующее положение нового рода *Thioflexithrix psekupsensis* gen. nov., sp. nov. штамм D3<sup>T</sup>. Последовательность Гаммапротеобактерии *Halothiobacillus neapolitanus* использовалась в качестве внешней группы. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “bootstrap” – анализа 1000 альтернативных деревьев. Масштаб, 0,05 замен на нуклеотидную позицию.

Уровень идентичности гена 16S рРНК штамма D3 с представителями семейства *Beggiatoaceae* составляет 86-88%, а с другими представителями порядка *Thiotrichales* - 83-86%. Это пороговое значение для выделения нового семейства (Yarza et al., 2014). Однако семейство *Beggiatoaceae* очень гетерогенно, и для очень ограниченного числа его представителей (всего для двух видов), доступны чистые культуры. Таким образом, на данный момент у нас недостаточно данных для реклассификации семейства и мы ограничиваемся описанием штамма D3 в качестве представителя нового рода.

### Диагноз *Thioflexithrix* gen. nov.

*Thioflexithrix* (Thi.o.fle'xi.thrix. Gr. neut. n. *theion* сера, L. masc. adj. *flexus* изогнутый, Gr. fem. n. *thrix* волос; N.L. fem. n. *Thioflexithrix*, серный изогнутый волос). Скользящая бесцветная серобактерия. Цилиндрические клетки объединены в трихомы. Сера запасается внутриклеточно. Клеточная стенка грамотрицательного типа. Obligatный хемолитоавтотрофный микроаэроб, использующий тиосульфат, сульфид или молекулярный водород в качестве доноров электронов. На основании филогенетического анализа гена 16S рНК род относится к семейству *Beggiatoaceae*. Типовой вид *Thioflexithrix psekupsensis*.

### Диагноз *Thioflexithrix psekupsensis* sp. nov.

*Thioflexithrix psekupsensis* (pse.kups.en'sis N.L. fem. adj. *psekupsensis* в честь реки Псекупс в Краснодарском крае, Россия, в которую впадает термальный серный источник, из которого был выделен штамм D3)

Бесцветные цилиндрические клетки с закругленными концами, размер 2.4-2.7 × 3.4-3.9 мкм, формируют трихомы длиной до 200 мкм. Размножаются путем поперечного бинарного деления клеток в нитях. Нити образуют гормогонии путем формирования некридиальных участков. Нити и гормогонии способны к скользящему движению. Запасают внутриклеточно глобулы элементной серы. Клетки часто содержат внутриклеточные гранулы полифосфатов и поли-β-гидроксиалканоата. Obligatный хемолитоавтотроф. Ацетат, сукцинат, малат, фумарат, оксалоацетат, цитрат, изоцитрат, лактат, формиат, пируват, аконат, глиоксилат, гликолят, метанол, этанол, бутанол, глюкоза, галактоза, арабиноза, раффиноза, сахароза, мальтоза, лактоза, сорбоза, глутамат, серин, аспартат, триптофан, аланин, гистидин, фенилаланин, аспарагин, пептон и дрожжевой экстракт не используются в качестве источников углерода. CO<sub>2</sub> ассимилируется через цикл Кальвина. РБФК относится к форме IАq. Может использовать в качестве доноров электронов тиосульфат, сульфид и молекулярный водород. Не использует в качестве доноров электронов CS<sub>2</sub>, S<sup>0</sup>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> и S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>. Штамм D3 – макроаэрофильный факультативный анаэроб. Способен к анаэробному дыханию на фумарате и ДМСО, и не способен дышать на сульфатах и нитратах.

В качестве источников азота утилизирует молекулярный азот, аммоний, нитрат, нитрит, пептон, гидролизат казеина, аспартат и дрожжевой экстракт. Не использует в качестве источника азота глутамат. Не гидролизует крахмал. Каталазаотрицательный. Оксидазоположительный. Рост осуществляется в пределах от 10 до 43 °С, с оптимумом при 32 °С. Диапазон рН для роста 6.8–7.6, оптимум - 7.2. Не способен расти при концентрации NaCl выше 2 % (w/v). Устойчив к рифампицину (100 мг/л). Г+Ц состав ДНК - 42.1 мол. %. Доминирующие жирные кислоты - C<sub>18</sub> : 1 ω7, C<sub>16</sub> : 0, и C<sub>16</sub> : 1 ω7. Доминирующий дыхательный липохинон - UQ<sub>6</sub>. Типовой штамм D3 (=KCTC 62399 =UNIQEM U981).

**Характеристика генома.** Драфт-геном *T. psekupsensis* удалось собрать в 5 контигов общим размером 3 904 281 п.н. Г+Ц состав, рассчитанный на основании геномной последовательности, составил 42,1 %. Число белок-кодирующих последовательностей составило 3331, из них 2185 с известными функциями и 1146 с неизвестными функциями. В геноме кодируется 60 РНК: 10 рРНК и 50 тРНК.

**Автотрофный рост.** Штамм D3 является облигатным автотрофом. В его геноме были выявлены гены всех ферментов цикла Кальвина-Бенсона-Бассама, за исключением генов седогептулозо-1,7-бифосфатазы и трансальдолазы. Однако известно, что реакция, катализируемая седогептулозо-1,7-бифосфатазой, у бактерий может осуществляться фруктозо-1,6-бифосфатазой с двойной специфичностью к сахарам (Tanoi et al., 1996), а вместо трансальдолазы может работать транскетолаза. Активность ключевых ферментов цикла Кальвина – РБФК и фосфорибулокиназы, а также вспомогательного фермента цикла – карбоангдразы составляет  $0,66 \pm 0,04$ ,  $1,71 \pm 0,1$  и  $44,0 \pm 2,1$  Е · мг белка<sup>-1</sup>, соответственно. Филогенетический анализ последовательности CbbL позволил установить, что РБФК штамма D3 относится к типу IAq (рис. 3).

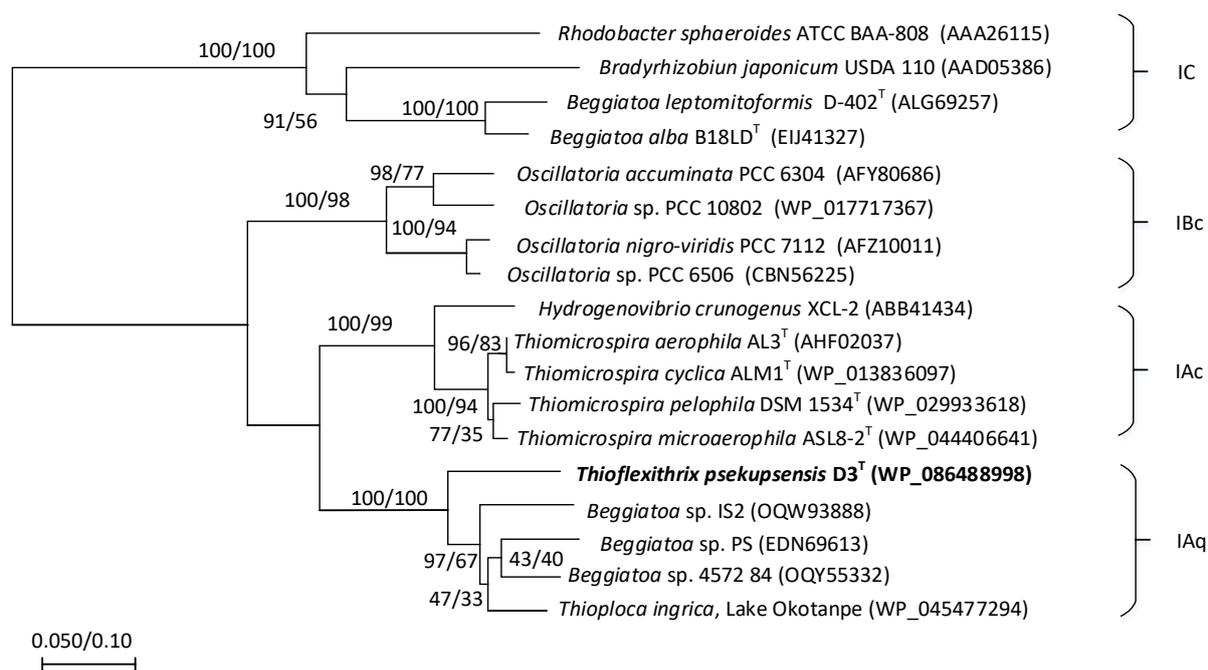


Рис. 3. Филогенетическое дерево, сконструированное на основании аминокислотных последовательностей CbbL при помощи методов Neighbour-joining / Maximum-likelihood methods, демонстрирующее положение представителя нового рода *Thioflexithrix psekupeensis* D3<sup>T</sup>. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “bootstrap” – анализа 1000 альтернативных деревьев. Масштаб, 0.05 / 0.1 замена на аминокислотную позицию.

**Литотрофный рост.** Было показано, что штамм D3 является облигатным хемолитотрофом. В качестве доноров электронов он может использовать восстановленные соединения серы: тиосульфат, сульфид или молекулярный водород. Рост в присутствии молекулярного водорода осуществляется за счет функционирования [NiFe]-гидрогеназ, гены которых были выявлены в геноме. Активность гидрогеназы составила  $3,8 \pm 0,2$  Е · мин<sup>-1</sup> мг белка<sup>-1</sup>.

Штамм D3 способен к литоавтотрофному росту в присутствии сероводорода, который окисляется до элементной серы при помощи белков Sqr и SoxF. Окисление тиосульфата в D3 происходит через путь SOX/DSR, который характеризуется отсутствием белков SoxCD и временным накоплением внутриклеточной серы, которая затем может окисляться комплексом rDSR. В геноме отсутствует отдельный ген *soxX*,

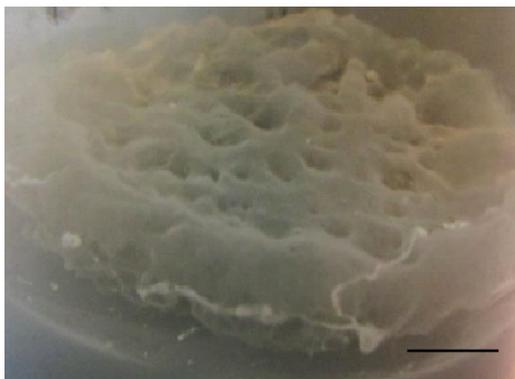


Рис. 4. Слизистые образования при культивировании *T. psekupsensis* D3. Масштаб, 1 см.

однако выравнивание последовательностей SoxA показало возможность функционирования гибридного белка SoxAX.

Для D3, как и для многих других представителей семейства *Beggiatoaceae*, механизм окисления сульфита до сульфата до конца не ясен. Гены, кодирующие Sor или Soe (прямое окисление сульфита, связанное с окислительным фосфорилированием), АФС-редуктазу и АТФ-сульфурилазу (непрямое окисление сульфита, связанное с субстратным фосфорилированием), не были обнаружены в его геноме.

**Адаптация к микроаэробным условиям.** *T. psekupsensis* является микроаэрофильным факультативным анаэробом. При культивировании *T. psekupsensis* в лабораторных условиях вокруг филламентов наблюдалось образование явно визуализированного слоя экстраклеточной субстанции, предположительно полисахаридного происхождения (рис. 4).

Было показано, что на синтез полисахаридов *Thioflexithrix* использует в 10 раз больше углерода, чем на синтез белка, что свидетельствует о важности полисахаридов в жизнедеятельности данного микроорганизма.

ГЖХ и ЯМР анализ показали, что экзополисахариды *T. psekupsensis* представлены галактаном, мономеры которого соединены 1,4-β-гликозидной связью.

Была определена активность фермента фосфоглюкомутазы, превращающего глюкозо-6-фосфат в глюкозо-1-фосфат, и связывающего гликолиз с синтезом экзополисахаридов. При увеличении концентрации кислорода в жидкости в 6 раз активность фосфоглюкомутазы возрастает в 45 раз (с  $14$  до  $640$  нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг белка<sup>-1</sup>). Все вышеперечисленное свидетельствует о важной роли экзополисахаридов в защите от кислородного стресса.

Синтез антиоксидантных ферментов может быть еще одним механизмом защиты от активных форм кислорода. В геномном сиквенсе были обнаружены гены нескольких антиоксидантных ферментов: *sodB* (кодирует Fe-зависимую супероксиддисмутазу (СОД), ЕС 1.15.1.1), *sodC* (кодирует Cu/Zn-зависимую СОД, ЕС 1.15.1.1) и *ccp* (кодирует цитохром с-551 пероксидазу, ЕС 1.11.1.5). Было показано, что при увеличении концентрации кислорода активность цитохром-с551 пероксидазы возрастает на 35 % (с  $2,1 \pm 0,1$  до  $3,3 \pm 0,15$  мкмоль·мин<sup>-1</sup>·мг белка<sup>-1</sup>), а активность СОД – на 55 % (с  $5,7 \pm 0,29$  до  $8,7 \pm 0,34$  мкмоль·мин<sup>-1</sup>·мг белка<sup>-1</sup>).

**Центральный метаболизм.** *T. psekupsensis* обладает дыхательным типом метаболизма. В его геноме закодированы все гены гликолиза, ЦТК и глиоксилатного цикла. Выявленная активность ферментов ЦТК и глиоксилатного цикла на 2 порядка ниже, чем у гетеротрофных прокариот. Такая низкая активность ферментов, вероятно, обуславливает облигатную автотрофию у штамма D3.

В геноме *T. psekupsensis* D3 имеется полный набор генов для компонентов электронтранспортной цепи. В геноме также закодированы гены терминальных анаэробных редуктаз: ДМСО-редуктазы и фермента с двойной специфичностью: фумаратредуктазы / сукцинатдегидрогеназы.

Таким образом, был описан новый род в составе семейства *Beggiatoaceae*. Для него показаны пути метаболизма углерода и серы.

***Beggiatoa leptomitiformis* sp. nov.**

До 2017 года в состав семейства *Beggiatoaceae* входил единственный вид с валидно опубликованным названием, для которого была доступна чистая культура – *Beggiatoa alba*. В чистой культуре также поддерживался штамм *Beggiatoa* D-402, выделенный еще в 1980-ые годы Дубининой Г.А. и Саввичевым А.С., но ранее не описанный. Получение геномного сиквенса для штамма D-402 дало возможность описать его как новый вид в составе рода *Beggiatoa* – *B. leptomitiformis*.

**Фенотипические и хемотаксономические характеристики.**

Дифференциальные характеристики штамма D-402<sup>T</sup> и типового штамма *Beggiatoa* - *B. alba* V18LD<sup>T</sup> (ATCC 33555) приведены в таблице 1.

**Филогенетический анализ.** Для определения филогенетического положения штамма D-402 было сконструировано дерево методами Neighbor-Joining и Maximum-Likelihood. Топология деревьев, построенных двумя методами, совпадала. Было показано, что штамм D-402<sup>T</sup> филогенетически наиболее близок к пресноводным представителям рода *Beggiatoa* и образует с ними отдельный филогенетический кластер (рис. 5). Уровень идентичности гена 16S рРНК штамма D-402 с ближайшими родственниками составил 98%, что указывает на межвидовые различия.

Белок-кодирующие гены также используются при определении новых видов. Поэтому функциональные гены *hsp60* были проанализированы в качестве дополнительных филогенетических маркеров для дифференциации таксонов на уровне видов и штаммов. Сходство нуклеотидных последовательностей гена *hsp60* (HQ909769) между D-402<sup>T</sup> и *B. alba* V18LDT (JF745935.1) составило 94%.

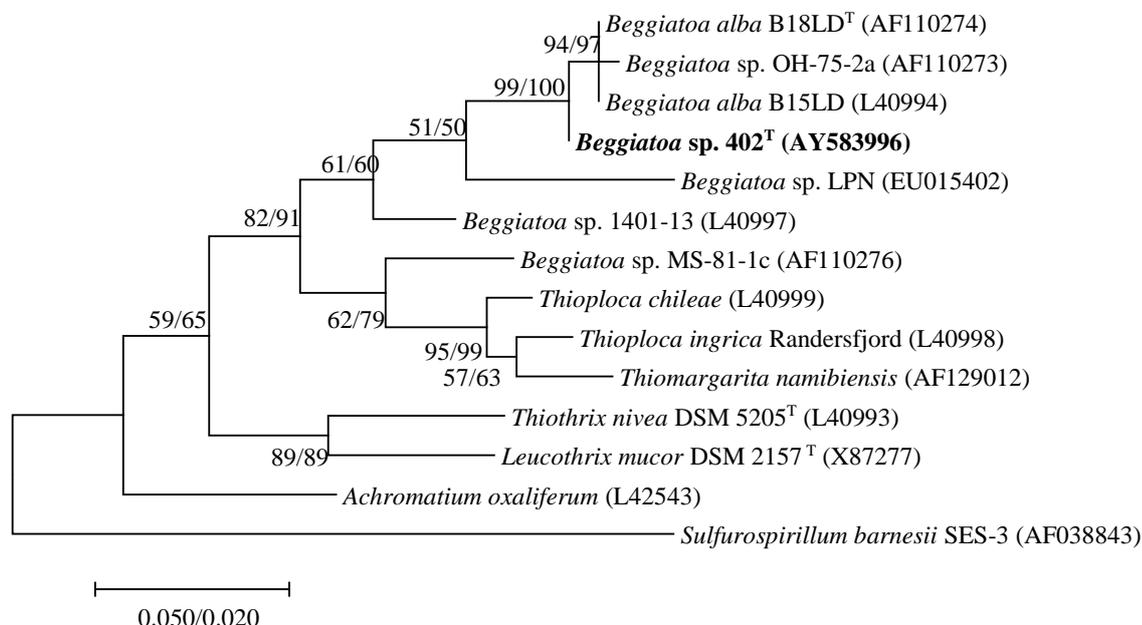


Рис. 5. Филогенетическое дерево, сконструированное на основании нуклеотидных последовательностей 16S рРНК методами Maximum-Likelihood / Neighbor-Joining, демонстрирующее положение нового вида *Beggiatoa leptomitiformis* sp. nov. штамм D-402<sup>T</sup>. Последовательность Эпсилонпротеобактерии *Sulphurospirillum barnesii* SES-3 использовалась в качестве внешней группы. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “bootstrap” – анализа 1000 альтернативных деревьев. Масштаб, 0,05 / 0,02 замены Джукса-Кантора на нуклеотидную позицию.

### Диагноз *Beggiatoa leptomitiformis* sp. nov.

*Beggiatoa leptomitiformis* (lep.to.mi.to.for'mis. Gr. adj. leptos тонкий; Gr. masc. n. mitos нить; L. fem. n. forma форма; N.L. fem. adj. *leptomitiformis* в форме тонкой нити).

Бесцветные цилиндрические клетки с закругленными концами, размер 1.0–2.5×3.5–4.0 мкм, формирует трихомы длиной до 50–200 мкм (до 1 см). Размножается путем поперечного бинарного деления клеток в нитях. Нити образуют гормогонии путем формирования некридиальных участков. Нити и гормогонии способны к скользящему движению. При росте в присутствии восстановленных соединений серы гранулы элементарной серы накапливаются в периплазме и инвагинатах цитоплазматической мембраны. Внутриклеточная сера может использоваться в качестве акцептора электронов в отсутствие кислорода. Клетки часто содержат гранулы полифосфатов или поли-β-гидроксиалканоата. Организмы способны к литоавтотрофному росту в присутствии сульфида, элементарной серы, тиосульфата, тетратионата, тритионата и молекулярного водорода. РБФК «красного» типа формы I. При окислении сероорганических соединений (тиоэтанол, тиоацетамид, диметилсульфид и ДМСО) сера запасается внутриклеточно. Способен использовать широкий спектр субстратов для органотрофного роста: органические кислоты (ацетат, акониат, пируват, лактат, малат, сукцинат и формиат), спирты (этанол, метанол и бутанол), углеводы (глюкоза, галактоза, арабиноза, раффиноза, сахароза, мальтоза, лактоза, сорбоза, левулоза, рибоза и ксилоза), аминокислоты (серин, триптофан, аланин, гистидин, фенилаланин, аспарагин, аргинин и валин), пептон и дрожжевой экстракт. Молекулярный азот, аммоний, нитрат, пептон, гидролизат казеина, аланин, аспартат, глутамат, серин, цистеин, цистин и метионин могут использоваться в качестве единственных источников азота. Гидролизует крахмал. Каталазаотрицательный. Оксидазаположительный. Растет при pH 6.0–8.2 с оптимумом при 7.5–7.8, при температуре 8–35 °C с оптимумом при 28 °C. Не способен расти при концентрации NaCl выше 0,3 % (w/v). Устойчив к рифампицину (100 мг/л) и неомицину (10 мг/л).

Типовой штамм D-402 (=DSM 14946=UNIQEM U 779T), выделенный из пресноводного источника, загрязненного промышленными и сельскохозяйственными сточными водами. Г+Ц состав ДНК 42.1 мол. %.

**Характеристика генома.** Геном *Beggiatoa leptomitiformis* D-402<sup>T</sup> представлен одной кольцевой хромосомой. Ее размер 4.27 млн п.о., а средний Г+Ц состав - 40,5%. Число белок-кодирующих последовательностей составило 3453, из них 1915 с известными функциями и 1538 с неизвестными функциями. В геноме кодируется 47 тРНК, 8 нкРНК, и 6 рРНК. Средняя длина гена приблизительно равна 1025 пар оснований, а плотность генов составляет 0,86 гена на т.п.о.

**Автотрофный рост.** В геноме штамма D-402 был обнаружен полный набор генов, необходимый для функционирования цикла Кальвина.

Чтобы подтвердить работу цикла, мы определили уровень экспрессии генов, кодирующих его ключевые ферменты, *prkB* и *rbcL*, при микроаэробном культивировании. Количественный ПЦР анализ продемонстрировал, что в микроаэробных литоавтотрофных условиях уровни *prkB*- и *rbcL*-мРНК были в 3 и 9,5 раза и в 4 и 13 раз выше, чем в литогетеро- и органогетеротрофных условиях соответственно.

**Серный метаболизм.** *B. leptomitiformis* способен к литотрофному росту в присутствии восстановленных соединений серы. При росте в присутствии тиосульфата последний окисляется до сульфата и элементарной серы, что соответствует окислению при помощи Sox-комплекса в отсутствие субъединиц SoxCD. В геноме не был выявлен отдельный ген *soxA*, однако выравнивание последовательностей SoxX позволило идентифицировать в нем все консервативные мотивы, необходимые для функционирования гибридного белка SoxAX. Гены каталитических субъединиц rDSR комплекса, который может окислять элементарную серу до сульфита, в геноме отсутствуют, поэтому дальнейший путь метаболизма серы неизвестен. Также неизвестен механизм окисления сульфита до сульфата.

Было установлено, что *B. leptomitiformis* D-402<sup>T</sup> может использовать, кроме тиосульфата, также сульфид в качестве донора электронов для литотрофного роста. Геномный анализ штамма D-402<sup>T</sup> выявил гены сульфид-хиноноксидоредуктазы и сульфид-дегидрогеназы (флавоцитохром c), участвующих в окислении сульфидов до серы.

Штамм D-402<sup>T</sup> также способен к литотрофному росту в присутствии молекулярного водорода за счет [NiFe]-гидрогеназ, гены которых также были выявлены в геноме.

**Метилотрофный рост.** *B. leptomitiformis* штамм D-402<sup>T</sup> способен к метилотрофному росту в аэробных условиях. При этом метанол может окисляться до формальдегида двумя PQQ-зависимыми метанолдегидрогеназами, HoxF и Mdh2; формальдегид далее окисляется до формиата по ТГМП пути, а формиат превращается в CO<sub>2</sub> с помощью NAD-зависимой формиатдегидрогеназы.

Для бактерий известно три основных пути усвоения углерода для анаболизма при метилотрофном росте: рибулозимонофосфатный (РМФ) цикл, сериновый цикл и цикл Кальвина-Бенсона-Бассама. Гены, кодирующие ключевые ферменты РМФ цикла, и несколько ферментов серинового цикла не были обнаружены в геноме *B. leptomitiformis*. Таким образом, эти циклы, по-видимому, не могут функционировать в D-402.

Было показано, что источником углерода для конструктивного метаболизма служит CO<sub>2</sub>, ассимилированный через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама. Функционирование двух типов метанолдегидрогеназ и ферментов цикла Кальвина-Бенсона-Бассама подтверждается увеличением уровня экспрессии соответствующих генов при метилотрофном росте относительно литогетеротрофного (рис. 7).

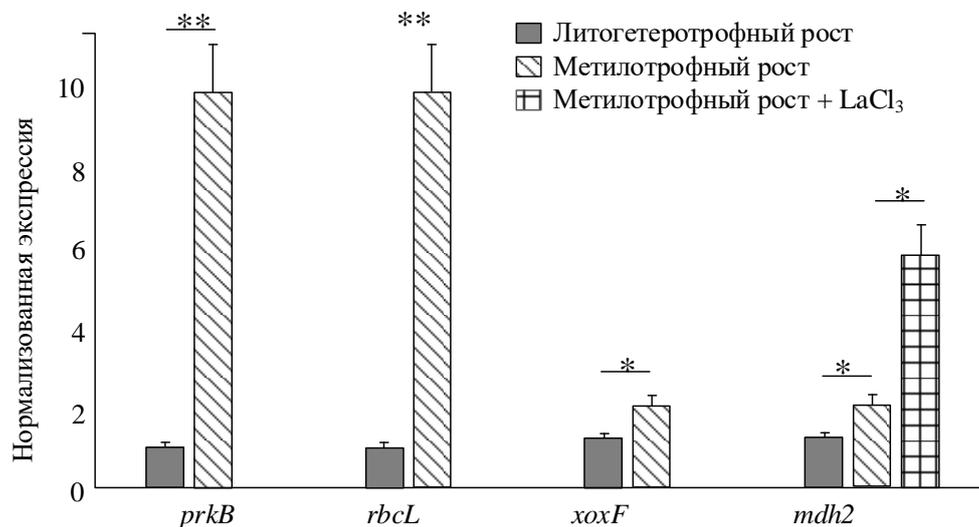


Рис. 7. Уровень экспрессии генов *prkB*, *rbcL*, *xoxF* и *mdh2* при литогетеротрофном росте, метилотрофном росте без La (III), и метилотрофном росте с La (III). Гены 16S рРНК и *gyrB* использовались в качестве референсов. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

При метилотрофном типе питания не происходит внутриклеточного накопления элементной серы (рис. 8Б).

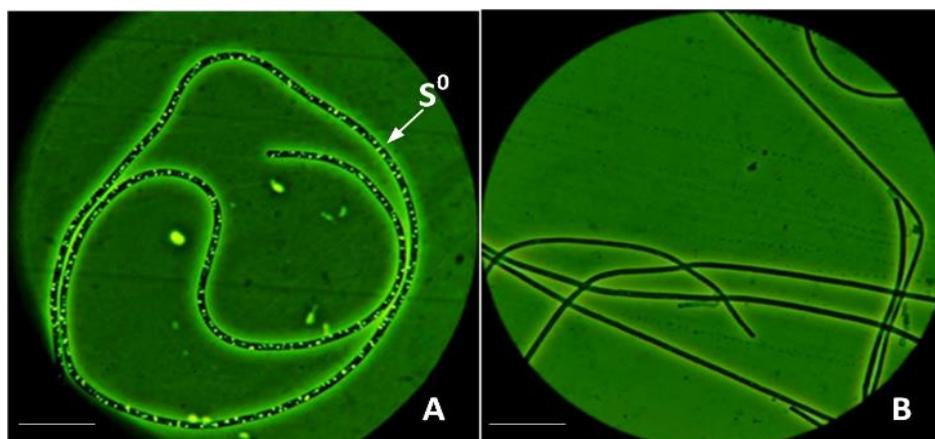


Рис. 8. Морфология *B. leptomitiformis* D-402<sup>T</sup> при культивировании в литотрофных (А) и метилотрофных (Б) условиях. Масштаб 10 мкм.

В присутствии La (III), как известно, происходит увеличение активности некоторых метанолдегидрогеназ (Chu et al. 2016; Hibi et al. 2011; Nakagawa et al. 2012). У *B. leptomitiformis* добавление La (III) в среду культивирования приводит к увеличению концентрации конечного продукта реакции, формальдегида, что приводит к увеличению количества промежуточных продуктов ТГМП-пути. Это, в свою очередь, приводит к увеличению концентрации формиата. Таким образом, добавление La (III) управляет механизмом каскадного увеличения конечных продуктов реакции и, как следствие, повышением эффективности ассимиляции метанола (рис. 7).

Таким образом, в результате проведенной работы был существенно расширен состав семейства *Beggiatoaceae*. Если ранее семейство было представлено только одним родом и одним видом, выделенным в чистую культуру, а остальные представители семейства находились в статусе *Candidatus*, то теперь в состав семейства входят два рода и три вида, выделенные в чистые культуры.

### *Azospirillum thiophilum* BV-S<sup>T</sup>

В состав рода *Azospirillum* входит 17 видов бактерий, но только для одного из них – *A. thiophilum* BV-S<sup>T</sup> – была показана способность к литотрофному росту в присутствии восстановленных соединений серы (Lavrinenko et al., 2010; Фролов и др., 2013).

Геном *A. thiophilum* был секвенирован и помещен в GenBank почти одновременно нашей (Fomenkov et al., 2016) и еще одной исследовательской группой (NZ\_LAEL00000000.1) (Kwak and Shin 2016). Однако в работе Kwak и Shin не проводился подробный анализ генома.

**Характеристика генома.** Геном *A. thiophilum* состоит из восьми замкнутых хромосом (NZ\_CP012401.1-NZ\_CP012408.1) с общей длиной 7,6 млн.п.о и средним содержанием G + C 68,2%. Семь замкнутых циклических генетических элементов имеют одинаковое покрытие около 370, что указывает на то, что они представлены одинаковым числом копий и, вероятно, реплицируются с примерно равной скоростью, за исключением хромосомы 7, которая имеет двойной охват 660 (Fomenkov et al., 2016). Было предсказано в общей сложности 6393 белок-кодирующих последовательностей (CDS), 79 тРНК, 4 нкРНК и 26 рРНК. 4328 CDS имеют сходство с последовательностями известных генов и 2065 CDS с неизвестными функциями. Средняя длина гена составляет приблизительно 1010 п.о., а плотность кодирования составляет 0,84 гена на т.п.о.

**Автотрофный рост.** Анализ полногеномной последовательности, полученной в нашей лаборатории, показал, что *A. thiophilum* содержит полный набор генов, необходимых для функционирования цикла Кальвина-Бенсона-Бассама. Организация генов аналогична двум ранее рассмотренным штаммам.

Для доказательства функционирования цикла Кальвина-Бенсона-Бассама при литоавтотрофном культивировании была определена активность одного из его ключевых ферментов – фосфорибулокиназы – и вспомогательного фермента цикла – карбоангидразы. Активность фосфорибулокиназы составила  $2,50 \pm 0,13$  мкмоль мин<sup>-1</sup> мг<sup>-1</sup> белка при литоавтотрофном культивировании и не была выявлена при литогетеротрофном. Активность карбоангидразы составила  $19,60 \pm 1,00$  и  $3,30 \pm 0,17$  у.е. · мин<sup>-1</sup>·мг белка<sup>-1</sup> при литоавто- и литогетеротрофном культивировании, соответственно.

Количественный ПЦР-анализ продемонстрировал, что уровень *rbcL*-мРНК в автотрофных условиях примерно в 8 раз выше, чем в гетеротрофных условиях.

**Серный метаболизм.** В микроаэробных условиях при литогетеро- или литоавтотрофном росте *A. thiophilum* способен к диссимиляционному окислению тиосульфата, что приводит к образованию сульфата и тетратионата. Сульфат образуется за счет SOX-системы (кодируется генами *soxAXBYZCD*), тогда как активность тиосульфатдегидрогеназы (кодируется геном *tsdA*) приводит к синтезу тетратионата. Также возможно диссимиляционное окисление сульфида до элементной серы за счет функционирования фермента Sqr.

Гены, другого фермента, участвующего в диссимиляционном окислении сульфида до элементной серы – SoxF, а также гены ферментов, участвующих в окислении серы до сульфита (*dsrABEFHCMLJOPNR*) и сульфита до сульфата (*cop, yed, apr* и *sat*), не были обнаружены.

**Метилотрофия.** *A. thiophilum* BV-S<sup>T</sup> способен к метилотрофному росту в аэробных условиях и может окислять метанол до CO<sub>2</sub> по тому же пути, что и *B. leptomitofomis*. Однако в его геноме закодированы все три типа метанолдегидрогеназ, MxaF, XoxF и Mdh2. Для проверки функционирования разных типов метанолдегидрогеназ было проведено сравнение экспрессии генов *mxaF*, *mdh2*, *xoxF* в

гетеротрофных, метилотрофных условиях, в метилотрофных условиях с хлоридом лантана. Было показано увеличение экспрессии *mxaF* в метилотрофных условиях в 18,6 раза по сравнению с гетеротрофными, *mdh2* — в 15,7 раза, *хоxF* — в 2,8 раза. Наличие лантаноидов в среде культивирования стимулировало экспрессию *mdh2* в 2 раза, *хоxF* — в 7,3 раза. Экспрессия же *mxaF* в присутствии La (III) снижалась в 2,5 раза. Таким образом, показано, что утилизация метанола в метилотрофных условиях обеспечивается в основном за счет работы МДГ 1 и 2 типа. Добавление La (III) включает в работу МДГ 3 типа, но ингибирует МДГ 1 типа (рис. 9).

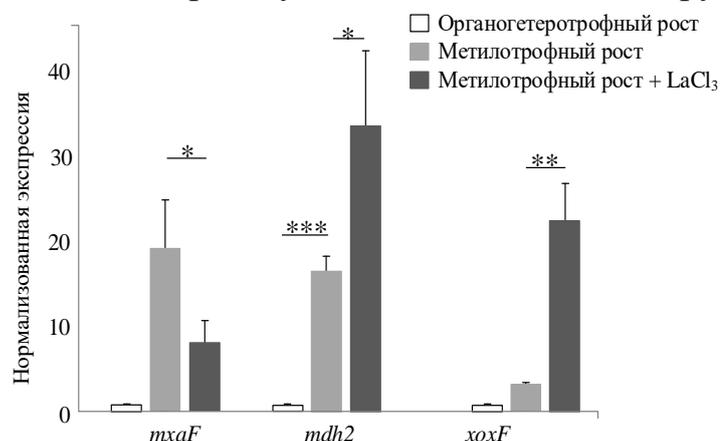


Рис. 9. Уровень экспрессии генов метанолдегидрогеназ у *A. thiophilum* при органогетеротрофном, метилотрофном и метилотрофном в присутствии La (III) росте. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

В геноме не были выявлены гены РМФ и серинового цикла,  $CO_2$  для конструктивного метаболизма ассимилируется через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама.

**Тип дыхательного метаболизма.** *A. thiophilum* использует дыхательный тип метаболизма. Он не способен к фототрофному росту и не может сбрасывать углеводы. Соответственно в его геноме был выявлен полный набор генов, кодирующих ферменты гликолиза, ЦТК и глиоксилатного цикла. Образующийся в ходе гликолиза пируват далее окисляется до ацетил-КоА посредством пируватдегидрогеназного комплекса.

Для подтверждения функционирования ЦТК и глиоксилатного цикла у *A. thiophilum* была определена активность большинства функционирующих в них ферментов. Были получены следующие значения ( $\mu\text{моль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  белка): малатдегидрогеназа NAD-зависимая,  $0,67 \pm 0,03$ ; цитратсинтаза,  $0,10 \pm 0,01$ ; аконитатгидратаза,  $0,39 \pm 0,02$ ; изоцитратдегидрогеназа NADP-зависимая,  $1,10 \pm 0,05$ ; сукцинатдегидрогеназа,  $0,58 \pm 0,03$ ; фумаратгидратаза,  $3,00 \pm 0,15$ ; изоцитратлиаза,  $0,11 \pm 0,01$ ; и малатсинтаза,  $0,12 \pm 0,01$ .

*A. thiophilum* был способен к анаэробному дыханию на тетрагидрате. При анализе генома был выявлен оперон, *ttrABC*, кодирующий А, В и С-субъединицы тетрагидратредуктазы соответственно.

Таким образом, геномные данные позволили подтвердить полученную ранее информацию о способности *Azospirillum thiophilum* к диссимиляционному окислению восстановленных соединений серы, что может быть связано с необычным местообитанием данной бактерии. В отличие от остальных азоспирилл, *A. thiophilum* была выделена не из почвы, а из серного источника.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе наших исследований был существенно расширен состав семейства *Beggiatoaceae*, объединяющего бесцветных сероокисляющих бактерий – был описан

новый вид *Beggiatoa leptomitiformis* sp. nov. и новый род и новый вид *Thioflexithrix psekupsensis* gen. nov., sp. nov. Уровень идентичности гена 16S рРНК *Thioflexithrix psekupsensis* с ближайшими филогенетическими соседями составляет только 86%, что является пороговым значением для выделения нового семейства. Однако семейство *Beggiatoaceae* очень гетерогенно, и для очень ограниченного числа его представителей доступны чистые культуры. Таким образом, на данный момент у нас недостаточно данных для реклассификации семейства, и мы ограничиваемся описанием нового рода.

Для бесцветных серобактерий характерно развитие в микрозоне градиента  $H_2S/O_2$ . В этих местообитаниях создаются микроаэробные условия, которые обуславливают особенности углеродного, азотного и серного метаболизма бактерий. Обитая в неравновесных условиях, бесцветные серобактерии постоянно находятся в состоянии стресса: их рост лимитируется концентрацией кислорода, наличием различных питательных веществ, а чаще они испытывают воздействие нескольких факторов. Поэтому бактерии должны обладать широким метаболическим потенциалом.

В ходе нашей работы были получены полногеномные последовательности трех штаммов бесцветных серобактерий, анализ которых позволяет выявить их метаболический потенциал и сделать вывод о возможности их адаптации к меняющимся условиям среды.

В случае *B. leptomitiformis* и *A. thiophilum* кислородный режим определяет тип метаболизма данных бактерий. В аэробных условиях они способны к органогетеротрофному и литогетеротрофному росту, но только в микроаэробных условиях они способны осуществлять литоавтотрофный рост в присутствии восстановленных соединений серы или молекулярного водорода. *T. psekupsensis* и вовсе не способен к аэробному росту, а является факультативно анаэробным микроаэрофилом. Этот штамм образует огромное количество экзополисахаридов, снижающих скорость диффузии кислорода в клетки.

Как известно, диазотрофные прокариоты, какими являются исследуемые бактерии, в природе занимают экониши с микроаэробными условиями. Именно микроаэробные условия обеспечивают высокую активность нитрогеназного комплекса, который, как известно, участвует в ассимиляции  $N_2$  и инактивируется при высоких концентрациях кислорода.

Анализ геномов и экспериментальные данные позволили выявить пути диссимиляционного окисления серных соединений исследованных представителей семейства *Beggiatoaceae* и *A. thiophilum*. В геномах были выявлены гены ферментов, окисляющих сульфид до элементной серы: *soxF*, кодирующий флавоцитохром *c* у *T. psekupsensis* и *B. leptomitiformis*, и *sqr*, кодирующий сульфид-хинон редуктазу у всех исследуемых бактерий.

Было показано, что у всех трех исследуемых бактерий окисление тиосульфата осуществляется за счет функционирования Sox-комплекса, а у *A. thiophilum* – еще и за счет тиосульфатдегидрогеназы. Нами было установлено, что активность тиосульфатдегидрогеназы индуцируется, а активность Sox-комплекса возрастает в микроаэробных условиях по сравнению с аэробными, что дает серобактериям возможность выживать при смене режима аэрации среды.

Представители семейства *Beggiatoaceae* при культивировании на сульфиде или тиосульфате способны к внутриклеточному накоплению глобул элементной серы,

которая исчезает после нескольких пассажей на среде без восстановленных серных соединений. В геноме *T. psekupsensis* был выявлен полный набор генов комплекса удалось *rDSR*, окисляющего серные глобулы до сульфита. В геноме *B. leptomitiformis* отсутствуют гены каталитических субъединиц комплекса, что характерно и для *B. alba* и некоторых других нитчатых серобактерий. Поэтому механизм окисления серы до сульфита у этих серобактерий до сих пор остается загадкой. Также для всех трех штаммов непонятен путь окисления сульфита до сульфата. Схемы серного метаболизма всех трех штаммов приведены на рисунке 10.

Во всех трех анализируемых геномах были выявлены гены, участвующие в функционировании и созревании [NiFe]-гидрогеназ (*hyaABCb* и *hypABCDE*), которые обеспечивают литотрофный рост в присутствии  $H_2$ .

Все три исследованных штамма способны к литоавтотрофному росту только в микроаэробных условиях за счет функционирования цикла Кальвина-Бенсона-Бассама. Цикл у всех исследованных серобактерий имеет общие особенности: 1) во всех геномах отсутствует ген седогептулозо-1,7-бисфосфотазы, и данная реакция катализируется фруктозо-1,6-бисфосфатазой с двойной специфичностью к сахарам; 2) у всех отсутствуют трансальдозазы, но функционируют транскетозазы, которые обеспечивают синтез пентоз в процессе регенерации акцептора - рибулозо-1,5-бисфосфата.

РБФК у представителей семейства *Beggiatoaceae* и *A. thiophilum* относится к разным формам: у *T. psekupsensis* форма IAq, у *B. leptomitiformis* - форма IC, а у *A. thiophilum* два типа РБФК, IC и IV.

*A. thiophilum* и *B. leptomitiformis* способны к росту на метаноле в качестве единственного источника углерода и энергии. Способность утилизировать это токсичное соединение имеет для них большое значение, поскольку они были выделены из местообитаний, в которых может присутствовать метанол – нефтегазоносная область Северного Кавказа (*A. thiophilum*) и источник, загрязненный сточными водами деревообрабатывающего комбината (*B. leptomitiformis*). Окисление метанола до формальдегида может осуществляться при помощи метанолдегидрогеназ, кодируемых генами *mxaF*, *hoxF* и *mdh2* у *A. thiophilum* и *hoxF* и *mdh2* у *B. leptomitiformis*, далее формальдегид окисляется до формиата через тетрагидрометанооптериновый путь и формиат далее окисляется до  $CO_2$  при помощи NAD-зависимых формиатдегидрогеназ. Образующийся в ходе метилотрофного роста эндогенный  $CO_2$  уже используется в конструктивном метаболизме, ассимилируясь в цикле Кальвина. Наличие нескольких типов метанолдегидрогеназ и ассимиляция не только эндогенного, но и экзогенного  $CO_2$ , значительно повышают адаптивный потенциал исследованных штаммов.

Установлено, что все исследованные сероокисляющие бактерии имеют дыхательный тип метаболизма. В качестве терминального акцептора электронов у всех исследованных штаммов может выступать кислород. У *T. psekupsensis* эту роль могут также выполнять ДМСО и фумарат, а у *A. thiophilum* – тетрагидрат. Возможность использования альтернативного акцептора электронов повышает адаптивный потенциал исследованных штаммов и служит приспособлением к меняющимся условиям среды.



расширить таксономическое разнообразие сероокисляющих бактерий, но также позволили выявить метаболическое разнообразие представителей родов *Beggiatoa*, *Thioflexithrix* и *Azospirillum*, их высокий адаптационный потенциал и обосновать приуроченность данных организмов к микроаэробным сероводородным биотопам.

## ВЫВОДЫ

1. Существенно расширен состав семейства *Beggiatoaceae* – описаны и узаконены 2 новых таксона (в том числе 1 новый род): *Thioflexithrix psekupsensis* gen. nov, sp. nov. и *Beggiatoa leptomitiformis* sp. nov. Для обоих штаммов из семейства *Beggiatoaceae* и для штамма *A. thiophilum* BV-S были получены геномные последовательности, анализ которых позволил выявить метаболический потенциал данных бактерий.

2. Показано, что *T. psekupsensis* D3<sup>T</sup> - облигатный хемолитоавтотроф, в то время как *B. leptomitiformis* D-402<sup>T</sup> и *A. thiophilum* BV-S<sup>T</sup> способны к органогетеротрофному, литогетеротрофному и литоавтотрофному росту. При литотрофном росте восстановленные соединения серы и молекулярный водород являются донорами электронов для энергетического метаболизма. *B. leptomitiformis* D-402<sup>T</sup> и *A. thiophilum* BV-S<sup>T</sup> переходят к литоавтотрофному росту только в микроаэробных условиях культивирования.

3. В геномах трех бактерий закодированы гены ферментов, окисляющие сульфид до элементной серы: *soxF*, кодирующий флавоцитохром *c* у *T. psekupsensis* и *B. leptomitiformis*, и *sqr*, кодирующий сульфид-хинон редуктазу у всех исследуемых бактерий. У всех трех исследуемых бактерий окисление тиосульфата происходит за счет функционирования Sox-комплекса: у нитчатых серобактерий это разветвленный, а у *A. thiophilum* - прямой Sox-путь. У *A. thiophilum* в окислении тиосульфата в микроаэробных и анаэробных условиях принимает участие тиосульфатдегидрогеназа. Литотрофный рост в присутствии H<sub>2</sub> у всех исследуемых бактерий осуществляется за счет функционирования [NiFe]-гидрогеназ.

4. Все три исследованных штамма способны к автотрофному росту за счет функционирования цикла Кальвина-Бенсона-Бассама. Во всех геномах отсутствует ген седогептулозо-1,7-бисфосфотазы и трансальдолазы, но эти реакции могут катализироваться фруктозо-1,6-бисфосфатазой и транскетолазой, соответственно. РБФК у *T. psekupsensis* D3 относится к форме IAq, у *B. leptomitiformis* D-402 – к форме IC, а у *A. thiophilum* BV-S – в геноме закодированы два типа РБФК: IC и IV.

5. *B. leptomitiformis* и *A. thiophilum* способны к метилотрофному росту при участии ТГМП-зависимого пути. Метанол может окисляться до формальдегида под действием различных метанолдегидрогеназ (*mxaF*, *hoxF* и *mdh2* у *A. thiophilum* и *hoxF* и *mdh2* у *B. leptomitiformis*). Ассимиляция C<sub>1</sub>-соединений осуществляется через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама.

6. Все три исследованных штамма являются diaзотрофами и имеют дыхательный тип метаболизма, способны к аэробному дыханию. *T. psekupsensis* и *A. thiophilum* способны к анаэробному дыханию: в качестве терминальных акцепторов электронов у *T. psekupsensis* может выступать ДМСО (гены *dmsABC*) и фумарат (*sdhABCD*), а у *A. thiophilum* – тетрационат (*ttrABC*).

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Экспериментальные статьи

1. Orlova M.V.\*, Tarlachkov S.V., Dubinina G.A., Belousova E.V., Tutukina M.N., Grabovich M.Y. Genomic insights into metabolic versatility of a lithotrophic sulfur-oxidizing diazotrophic Alphaproteobacterium *Azospirillum thiophilum* // FEMS Microbiology Ecology. – 2016. – V. 92. - pii: fiw199. (БАК; WoS, импакт-фактор 3,72)
2. Dubinina G., Savvichev A., Orlova M.\*, Gavrish E., Verbarq S., Grabovich M. *Beggiatoa leptomitiformis* sp. nov., the first freshwater member of the genus capable of chemolithoautotrophic growth // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2017. – V. 67. – P.197-204. (БАК, WoS импакт-фактор 2,134)
3. Gureeva M.V., Belousova E.V., Dubinina G.A., Novikov A.A., Kopitsyn D.S., Grabovich M.Y. *Thioflexithrix psekupensis* gen. nov., sp. nov., a filamentous gliding sulfur bacterium from the family *Beggiatoaceae* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2019. – V. 69. - P. 798-804. (БАК, WoS импакт-фактор 2,134)
4. Orlova M.\*, Tarlachkov S., Kulinchenko E., Dubinina G., Tutukina M., Grabovich M. Genomics and biochemistry of metabolic pathways for the C 1 compounds utilization in colorless sulfur bacterium *Beggiatoa leptomitiformis* D-402 // Indian Journal of Microbiology. – 2018 – V. 58 – P. 415–422. (БАК, Scopus, импакт-фактор 1,31)
5. Fomenkov A.I., Tamas V., Grabovich M.Y., Dubinina G., Orlova M.\*, Belousova E., Roberts R.J. Complete genome sequence of the freshwater colorless sulfur bacterium *Beggiatoa leptomitiformis* Neotype Strain D-402<sup>T</sup> // Genome Announcements. – 2015/ - V. 10.- pii: e01436-15. (БАК, Scopus импакт-фактор 1,18)
6. Fomenkov A., Vincze T., Grabovich M., Dubinina G., Orlova M.\*, Belousova E., Roberts R.J. Genome sequence and methylome analysis of the freshwater colorless sulfur bacterium *Thioflexothrix psekupsi* D3 // Genome Announcements. – 2017 – V. 5. - pii: e00904-17.. (БАК, Scopus импакт-фактор 1,18)
7. Fomenkov A.I., Vincze T., Grabovich M.Y., Anton B.P., Dubinina G.A., Orlova M.V.\*, Belousova E.V., Roberts R.J. Complete genome sequence of a strain of *Azospirillum thiophilum* isolated from a sulfide spring // Genome Announcements. – 2016. – V. 7. - pii: e01521-15. (БАК, Scopus импакт-фактор 1,18)
8. Руденко Т.С., Орлова М.В.\*, Слепченко А.В., Шацкий Н.Д., Смольяков Д.Д., Грабович М.Ю. Метилотрофия у *Azospirillum thiophilum* BV-S // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2018. - Т. 18. - С. 438 -442. (БАК)
9. Орлова М.В.\*, Федоненко Ю.П., Евстигнеева С.С., Белоусова Е.В., Грабович М.Ю. Газохроматографическое изучение состава экзополисахаридов и их роли в защите от оксидативного стресса у микроаэрофильных бактерий «*Thioflexothrix psekupsi*» D3 gen. nov., sp. nov. // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2015 – Т. 15 – С. 578-585 (БАК)
10. Орлова М.В.\*, Шацкий Н.Д., Белоусова Е.В., Грабович М.Ю. Способность пресноводных нитчатых серобактерий семейства *Beggiatoaceae* к ассимиляции молекулярного азота: молекулярная детекция и экспрессия маркерного гена азотфиксации *nifH* // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2016. – Т. 16. - С. 550-555 (БАК)

## Тезисы конференций

1. Characterization of a new genus *Thioflexothrix* from the family *Beggiatoaceae* / Orlova M.\*, Belousova E., Sapeltseva J., Fomenkov A., Dubinina G., Vincze T., Roberts R., Grabovich M. // Extremophiles 2014 / 10-th international congress of extremophiles – Saint-Petersburg, 2014
2. Орлова М.В.\*, Синюгина Д.И., Лютова Л.В. Защитная роль экзополисахаридов и ферментов при оксидативном стрессе бактерий рода *Thioflexothrix* - *Thioflexothrix psekupsii* gen. nov., sp. nov. // Биология - наука XXI века / 19-я международная пушинская школа-конференция молодых ученых - Пушино, Россия, 2015;
3. Орлова М.В.\*, Кулинченко Е.И., Лютова Л.В., Грабович М.Ю. Серный метаболизм “*Thioflexothrix psekupsii*” gen. nov., sp. nov. // Автотрофные микроорганизмы / 5-й Всероссийский симпозиум с международным участием - Москва, Россия, 2015
4. Орлова М.В.\*, Шацкий Н.Д., Белоусова Е.В., Грабович М.Ю. Способность к фиксации молекулярного азота у пресноводных нитчатых серобактерий семейства *Beggiatoaceae* // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой / VIII Всероссийская конференция молодых ученых - Саратов, Россия, 2016
5. Orlova M.\*, Rogozhin E., Fomenkov A., Grabovich M. Expression and purification of a recombinant thiosulfate dehydrogenase from *Azospirillum thiophilum* BV-S and its structural characterisation. // 7<sup>th</sup> FEMS 2017 / Congress of European microbiologists - july 9-13, 2017, Valencia, Spain.
6. Fomenkov A., Sun Z., Vincze T., Orlova M.\*, Anton B., Grabovich M., Roberts R. Complete genome sequence and methylome analysis of *Beggiatoa leptomitiformis* strains D401 and D402. // 7<sup>th</sup> FEMS 2017 / Congress of European microbiologists - july 9-13, 2017, Valencia, Spain
7. Грабович М.Ю., Орлова М.В.\* Метаболический потенциал *Azospirillum thiophilum* BV-S // 1-й Российский микробиологический конгресс - Пушино, 17-18 октября, 2017.
8. Белоусова Е.В., Орлова М.В.\*, Фоменков А.И., Грабович М.Ю. Полногеномный сиквенс и метиломный анализ пресноводной бесцветной серобактерии *Thioflexothrix psekupsii* D3. // 1-й Российский микробиологический конгресс. - Пушино, 17-18 октября, 2017.
9. Orlova M.\*, Grabovich M., Rudenko T. Rogozhin E. Sulfur metabolism of *Azospirillum thiophilum* BV-S // 5<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism (ISMSM-5) - 16-18 April 2018, Vienna, Austria.

\* Орлова = Гуреева