Ельченинов Александр Геннадьевич

## МЕТАБОЛИЗМ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ФИЛУМА *PLANCTOMYCETES*, ОБИТАЮЩИХ В ТЕРМАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ

1.5.11 – Микробиология

# АВТОРЕФЕРАТ диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Работа выполнена в лаборатории метаболизма экстремофильных Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Научный руководитель: Кубланов Илья Валерьевич,

> кандидат биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией метаболизма экстремофильных прокариот ФИЦ Биотехнологии

PAH

Земская Тамара Ивановна, Официальные оппоненты:

> доктор биологических наук, заведующий лабораторией микробиологии углеводородов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук

Намсараев Зоригто Баирович,

кандидат биологических наук, начальник лаборатории синтетической биологии Федерального государственного бюджетного «Национальный учреждения исследовательский

центр «Курчатовский институт»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное

учреждение науки Институт обшей экспериментальной биологии Сибирского

Отделения Российской академии наук

Защита диссертации состоится 30 июня 2022 г. в 14-00 на заседании диссертационного совета 24.1.233.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60летия Октября д.7, корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН (117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября д.7, корп.2.) и на сайте ФИЦ Б

Автореферат разослан «»2022 года  Ученый секретарьдоктор биологических науч	иссертационного совета	Хижняк Татьяна Владимировна
Автореферат разослан «»2022 года	Ученый секретарь	доктор биологических наук
	Автореферат разослан «»	2022 года

### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Планктомицеты – бактериальный филум, входящий в монофилетическую группу, называемую иногда PVC суперфилумом (Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae) (Wagner and Horn, 2006). Первые упоминания о планктомицетах известны с начала ХХ-го века, однако активно изучать их стали лишь с 1980-х годов. Долгое время считалось, что они значительно отличаются от других бактерий, так как в их клеточных стенках отсутствует пептидогликан (Liesack et al., 1986), они имеют отделенные мембраной компартменты внутри клеток (Lindsay et al., 2001) и обладают способностью к эндоцитозу (Lonhienne et al., 2010). В последние годы благодаря активному изучению данной группы, а также усовершенствованию методов исследований произошел настоящий прорыв в понимании биологии планктомицетов (Wiegand et al., 2018): многие из "особенностей" артефактами. Так сейчас известно, что клеточная стенка планктомицетов содержит ультратонкий слой пептидогликана (Jeske et al., 2015), а при 3D-реконструкции клеток оказалось, что компартменты вовсе не замкнуты, а связаны между собой и образуют периплазматическое пространство сложной архитектуры (Santarella-Mellwig et al., 2013). Тем не менее, все еще крайне мало информации об истинном разнообразии и особенностях метаболизма планктомицетов, так как ~99% из них являются до сих пор некультивируемыми и лишь для ~4% известны последовательности геномов (Wiegand et al., 2018).

Представители филума Planctomycetes обнаружены в самых разнообразных местообитаниях, таких как почва, пресные и морские водоемы (Wiegand et al., 2018), а также в экстремальных экосистемах: пустыня Атакама в Южной Америке (Drees et al., ультрапресные кислые северные болота (Kulichevskaya et al., 2007; Kulichevskaya et al., 2009; Ivanova and Dedysh, 2012; Kulichevskaya et al., 2016). Планктомицеты были детектированы и в термальных экосистемах (Hugenhlotz et al., 1998; Portillo et al., 2009; Lau et al., 2009), однако до недавнего времени не было охарактеризовано ни одной чистой культуры термофильных планктомицетов. Первые такие организмы были выделены лишь в 2015 году: Tepidisphaera mucosa и Thermogutta terrifontis – из наземных горячих источников, Thermogutta hypogea – из потока термальной воды в золотодобывающей шахте (Kovaleva et al., 2015; Slobodkina et al, 2015). Наряду с аэробным метаболизмом эти микроорганизмы, в отличие от мезофильных родственников, были способны к брожению (Kovaleva et al., 2015; Slobodkina et al., 2015), а *Thermogutta* была способна и к анаэробному дыханию. Позже был описан еще один термофильный представитель Planctomycetes - Thermostilla marina (Slobokina et al., 2016), выделенный из морской гидротермы и также являющийся факультативным анаэробом. Однако, даже с учетом этих работ, можно утверждать, что сделаны только первые шаги к полному пониманию планктомицетов и их распространения в горячих источниках.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы являлось описание новых представителей филума *Planctomycetes*, обитающих в термальных экосистемах, и изучение их метаболизма, в первую очередь путей деструкции полисахаридов, центрального катаболизма углеводов и механизмов запасания энергии.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1. Описать новых представителей планктомицетов, обитающих в термальных экосистемах.
- 2. Получить и проанализировать последовательность генома термофильного планктомицета *Thermogutta terrifontis* R1 с целью реконструировать пути гидролиза используемых этой бактерией полисахаридов, пути центрального метаболизма углеводов и запасания энергии.
- 3. Идентифицировать гены *Thermogutta terrifontis* R1, кодирующие ферменты, участвующие в деструкции ксантановой камеди, с использованием транскриптомики.
- 4. Получить последовательность генома термофильного планктомицета *Tepidisphaera mucosa* 2842, проанализировать его метаболические возможности и провести сравнительный геномный анализ всех представителей класса *Phycisphaerae*.

Научная новизна и теоретическая значимость работы. В ходе работы были охарактеризованы новые представители филума Planctomycetes, выделенные из термальных мест обитания и образующие два новых рода в семействах Isosphaeraceae Gemmataceae. Получена и проанализирована геномная последовательность термофильного планктомицета Thermogutta terrifontis R1. реконструирован метаболизм T. terrifontis R1 - от гидролиза полисахаридов домеханизмов запасания энергии. На основании транскриптомного и сравнительногеномного анализа был предложен новый путь гидролиза ксантановой камеди. Получена и проанализирована последовательность генома Tepidisphaera mucosa 2842. Проведен сравнительный анализ геномов представителей класса *Phycisphaerae*, позволивший выявить его разделение на две метаболические группы, а также провести полноценный филогеномный анализ этого класса планктомицетов.

**Практическая** значимость работы. Обладая множеством гидролитических ферментов, планктомицеты могут послужить источником новых гидролаз для биотехнологии; особенно перспективными в данной области могут оказаться термофильные представители (DeCastro et al., 2016). Так, ферменты, участвующие в деструкции ксантановой камеди, из *Thermogutta terrifontis*, могут снижать ее вязкость; и из них может быть сформирован ферментный препарат для нефтяной промышленности, так как ксантановая камедь широко используется в составе буровых растворов и жидкостей для гидроразрыва.

**Апробация работы.** Материалы диссертации представлены на X-ой молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (27-30 октября 2015, Москва, Россия), V съезде биохимиков России (4-8 октября 2016, Сочи, Россия), 1-ом Российском Микробиологическом Конгрессе (17-18 октября 2017, Пущино, Россия), 8<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists FEMS2019 (7-11 july 2019, Glasgow, UK).

**Публикации.** По материалам диссертации было опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах и 4 тезисов конференций.

Объем и структура. Диссертация состоит из введения, 10 глав, заключения, выводов и списка литературы. Текст работы изложен на 116 страницах, содержит 37 рисунков

и 16 таблиц. Список литературы содержит 206 наименований, из них 2 – на русском и 204 – на английском языке.

**Место проведения работы и благодарности.** Работа выполнена в лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН с 2015 по 2022 годы.

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю Илье Валерьевичу Кубланову за обучение методам геномного и филогенетического анализа, а также за помощь в планировании работы, в написании статей и тезисов конференций. Автор также благодарен всем сотрудникам Отдела биологии экстремофильных микроорганизмов, и особенно Елизавете Александровне Бонч-Осмоловской, за создание крайне благоприятной для научного творчества атмосферы.

Работа была выполнена в рамках и при поддержке проектов "Хотзаймс - систематический скрининг новых гидролаз в гидротермальных местообитаниях" ("HotZyme - Systematic screening for novel hydrolases from hot environments") и РНФ № 17-74-30025 "Энергоносители микробного происхождения: продуценты, пути образования, лабораторные модели получения". Автор выражает благодарность всем участникам этих проектов.

### СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объекты исследования.** Объектами таксономических исследований служили штаммы GM2012 и 2918, выделенные сотрудницей ИНМИ Ковалевой О.Л. Кроме того, объектами исследования были накопительные и чистые культуры планктомицетов, выделенные из горячих источников в ходе этой работы. Для проведения геномного анализа использовали штаммы *Thermogutta terrifontis* R1 и *Tepidisphaera mucosa* 2842, также выделенные Ковалевой О.Л.

**Отбор проб.** Пробы из горячих источников отбирали в 50 мл флаконы или 15 мл пробирки Хангейта с газонепроницаемыми пробками, которые заполняли до самого верха, герметично закрывали и транспортировали в лабораторию. Во время отбора проб измеряли значения температуры и рН в источниках.

Приготовление сред. Для получения накопительных культур с высоким содержанием планктомицетов использовали модифицированную среду Пфеннига с уменьшенной концентрацией минеральных солей. Дополнительно в среду вносили 1 мл л<sup>-1</sup> р-ра витаминов (Wolin et al., 1963) и 1 мл л<sup>-1</sup> р-ра микроэлементов (Кевбрин и Заварзин, 1992). Все полисахариды вносили в среду до стерилизации (0.2%), за исключением ксантановой камеди, которую добавляли из стерильного 1% стокового раствора. Моносахариды вносили до концентрации 0.2% с использованием стоковых растворов, полученных фильтрованием через 0.22 мкм фильтр. Для определения оптимального для роста штаммов рН в среду вносили определенный буфер до концентрации 0.01 М (рН 4.5-6.0 — ацетатный буфер; 6.5-8.0 — HEPES; 8.5-9.0 — HEPBS) и доводили рН среды до нужных значений. Для определения оптимальной для роста температуры проводили культивирование при различных температурах при оптимальном для каждого из штаммов значении рН в среде. Среду разливали в пробирки или флаконы и стерилизовали при 1 АТИ. В каждую пробирку или флакон с помощью стерильного шприца вносили 1% (V/V) посевного материала. Для получения анаэробной среды ее

кипятили в течение 10-15 минут и охлаждали на водяной бане под непрерывным током  $N_2$  (с пробулькиванием газа). После охлаждения в среду добавляли витамины и микроэлементы, подводили рН до необходимого значения. Среду переливали в дозатор под током  $N_2$ , после чего ее разливали по пробиркам. Элементную серу добавляли непосредственно в пробирки (1 г  $n^{-1}$ ). Другие акцепторы электронов вносили из стерильных стоковых растворов, полученных фильтрованием: нитрат (10 мМ), нитрит (2 мМ), сульфат (10 мМ), тиосульфат (10 мМ), фумарат (10 мМ).

**Оценка роста культур.** Рост штаммов определяли с помощью прямого подсчета клеток с использованием светового фазово-контрастного микроскопа Leica DM500.

**Получение накопительных и чистых культур.** Для получения накопительных культур с доминированием целевых микроорганизмов подбирали условия культивирования, благоприятные для роста их клеток, и вносили антибиотики (ампициллин, стрептомицин). Для получения чистых культур использовали метод десятикратных предельных разведений.

**Выделение** Д**НК/РНК.** Выделение ДНК из накопительных культур и чистых культур проводили с использованием фенол-хлороформной экстракции (Park, 2007; Gavrilov et al., 2016). Для выделения тотальной РНК *T. terrifontis* R1 из клеток, выращенных на среде с добавлением трегалозы и ксантановой камеди, использовали TRI-реагент.

Секвенирование и сборка геномов и транскриптома. Геном *T. terrifontis* R1 секвенировали с использованием комбинации технологий Illumina и Roche/454. Гибридную сборку проводили с использованием Newbler (Margulies et al., 2005) и Phred/Phrap/Consed (Gordon et al., 1998). Выделенная РНК штамма R1 была обратно транскрибирована в кДНК обратной транскриптазой. Тотальная кДНК была секвенирована на платформе Illumina. Прочтения были картированы на геномную последовательность с помощью BWA 0.7.8 (Li and Durbin, 2009). Сопоставление последовательностей кДНК и генов осуществляли с использованием пакета Subread (Liao et al., 2013). Дифференциальную экспрессию генов между двумя образцами определяли в edgeRun (Dimont et al., 2015).

Для секвенирования генома *Tepidisphaera mucosa* 2842 использовали Illumina MiSeq. Исходная сборка была получена с использованием CLC *de novo* assembler. Разрывы в контигах генома закрывали в GapFiller 1.11 (Boetzer and Pirovano, 2012), контиги пересобирали с использованием SSPACE 2 (Boetzer et al., 2011). Ориентацию полученных контигов проводили при помощи секвенирования ПЦР-продуктов, полученных с праймеров комплементарных концам контигов. Геномы штаммов GM2012 и 2918 секвенировали с использованием Illumina MiSeq; сборку *de novo* проводили с использованием SPADES 3.10.0 (Bankevich et al., 2012) и Unicycler 0.4.8 (Wick et al., 2017), соответственно.

Филогенетический анализ. Нуклеотидные последовательности и конкатенированные аминокислотные последовательности выравнивали с использованием MAFFT (Katoh et al., 2017). Аминокислотные последовательности отдельных белков выравнивали в Muscle (Edgar et al., 2004). Для идентификации и выравнивания консервативных белков из набора bac120 использовали gtdb-tk (Parks et al., 2018). Обработку полученных выравниваний проводили в Gblocks 0.9 (Castresana, 2000) или trimAL 1.4.1 (Capella-Gutierrez et al., 2009). Построение филогенетических деревьев проводили методом максимального правдоподобия в MEGA7 (Киmar et al., 2016) или RAxML 8.2.12 (Stamatakis, 2014).

Геномный анализ. Для начальной автоматической аннотации геномов использовали серверы RAST (Aziz et al., 2008) или IMG (Chen et al., 2019). Для более точного определения функций белков использовали различные базы данных: Pfam 27.0 (Finn et al., 2014), COG (Galperin et al., 2015), dbCAN (Zhang et al., 2018) — для детекции генов CAZymes. Предсказание локализации белков проводили с использованием SignalP 4.1 (Petersen et al., 2011), TMHMM 2.0 (Krogh et al., 2001) и SecretomeP. Для детальной *in silico* реконструкции метаболизма предполагаемые функции проверяли вручную с использованием BLAST против базы данных SwissProt и с использованием филогенетических методов, а также анализа генного контекста.

Для вычисления ANI использовали pyani 0.2.7 (Pritchard et al., 2016), для вычисления AAI – AAI-matrix calculator, для предсказания уровня ДНК-ДНК гибридизации – GGDC 2.1 (Meier and Kolthoff, 2013).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Выделение новых планктомицетов, обитающих в горячих источниках

Образцы, отобранные в горячих источниках Чукотки и района озера Байкал, были использованы для получения накопительных культур с добавлением различных полисахаридов в качестве источников углерода и энергии (Табл. 1). Основной выбор пал на образцы, содержащие большое количество микробных обрастаний или органических остатков. После культивирования в течение 7-14 дней в нескольких накопительных культурах можно было обнаружить клетки, морфологически сходные с представителями *Planctomycetes*. Накопительные культуры 3702, 3720 и 3726, растущие на ксилоглюкане, а также 3753 и В2 (54°С), растущие на ксантановой камеди, были выбраны для дальнейшей работы.

Таблица 1. Природные образцы и полученные в ходе работы с ними накопительные культуры

Образец	Описание образца	Регион	T, °C	рН	Субстраты
3702	маты, осадок, вода (T=67°C / pH=7.0)	Чукотка, 65.8063/ -173.3954	60		
3708	осадки и вода (T=79°C / pH=6.7)	Чукотка, 65.8063/ -173.3962	70		ксилоглюкан (XylG)
3713A	маты и вода (T=54°C / pH=7.3)	Чукотка,65.8064/ -173.3963	54		ксантановая камедь
3720	обрастания и вода (T=61°C / pH=6.5)	Чукотка, 65.8064/ -173.3984	60		(XG)
3726	черный осадок и вода (T=62°C / pH=6.8)	Чукотка, 65.8057/ -173.3966	60		галактан (Gal)
3733A	маты и вода (T=74°C / pH=6.9)	Чукотка, 65.8066/ -173.3887	70	7.0	пектин (Рес)
3738	маты, песок и вода (T=59-61.4°C / pH=8.0)	Чукотка, 64.7367/ -172.8488	60	7.0	
3753	маты и вода (T=59°C / pH=6.8)	Чукотка, 64.4357/ -172.5214	60		
B1	бежевый осадок (T=44.5°C / pH=6.0-7.5)				ксилоглюкан (XylG)
B2	песок и вода (T=53.5°C / pH=7.0)	Байкал, 52.9873/ 108.3078	47		ксантановая камедь
В3	вода (T=56°C / pH=7.0)	Байкал, 32.30/3/108.30/8	54		(XG)
ВЗ	вода (1–30 С/рп–7.0)				пектин (Рес)

Анализ V4-фрагментов генов 16S pPHK показал, что в накопительных культурах 3702XylG, 3720XylG, 3726XylG и 3753XG одним из доминирующих таксонов был род *Thermogutta*, он составлял 28-74% от всех прокариот. В накопительной культуре В2-54 более 90% последовательностей относились к одному таксону, входящему в порядок *Tepidisphaerales*. Из всех выбранных накопительных культур были получены чистые культуры: штаммы 3702XylG, 3720XylG, 3726XylG и 3753XG, выделенные из горячих источников Чукотки, были близки к *Thermogutta terrifontis* R1 (99-100% сходства по гену 16S pPHK), штамм В2-54 представлял новый род "*Fontivita*" в порядке *Tepidisphaerales* (91.26% и 90.67% сходства по гену 16S pPHK с ближайшими родственниками, *Tepidisphaera mucosa* 2842 и "*Humisphaera borealis*" M1803). Таким

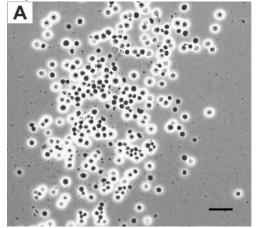
образом, экспериментально подобранные условия – пониженная минерализация среды и использование полисахаридов в качестве субстратов – позволили получить сообщества, обогащенные планктомицетами (больше 20% от состава сообщества).

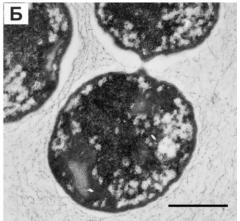
### 2. Характеристика новых штаммов планктомицетов GM2012 и 2918

Штаммы планктомицетов GM2012 и 2918, выделенные О.Л. Ковалевой из термальной воды в золотодобывающей шахте ТауТона (ЮАР) и из горячего источника около р. Карымша (Камчатка, Р $\Phi$ ), соответственно, были переданы автору для дальнейшего описания.

### 2.1. Описание штамма GM2012 в качестве нового рода и вида Tautonia sociabilis

Клетки штамма GM2012 были представлены неподвижными кокками, 1.7-2.9 мкм в диаметре (рис. 1A); встречались в виде одиночных клеток, пар или образовывали крупные бесформенные скопления; размножались почкованием (рис. 1Б).





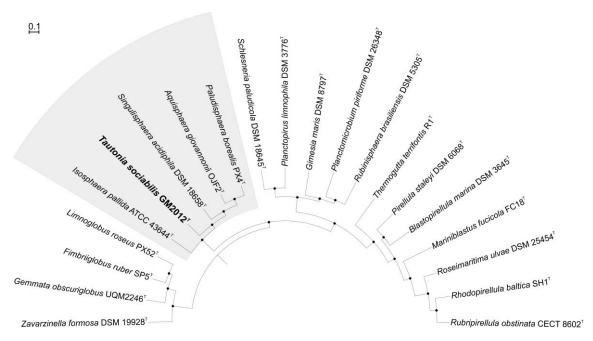
**Рисунок 1.** Морфология клеток GM2012:

А – общий вид клеток при использовании фазовоконтрастного микроскопа (масштаб 10 мкм),

Б – ультратонкий срез клеток (масштаб 1 мкм).

Рост наблюдался в диапазоне температур от 37°C до 46°C; рост при 30°C и ниже, а также при 50°C и выше, не наблюдали, то есть изолят являлся термотолерантным. Диапазон значений рН, пригодных для роста штамма, составлял от 5.5 до 9.0; рост при рН 5.0 и ниже, а также 9.5 и выше, не наблюдался. Оптимальными условиями роста штамма GM2012 были 42°C рH 7.5-7.7. Штамм GM2012 хемоорганогетеротрофом и мог расти на ксилозе, глюкозе, маннозе, галактозе, мальтозе, лактозе, трегалозе, декстрине, крахмале или ксантановой камеди. В то же время он не был способен утилизировать арабинозу, фруктозу, целлобиозу, сахарозу, раффинозу, дестран, ксилан, пектин, агарозу, целлюлозу. Рост в анаэробных условиях не проявлялся как при отсутствии внешнего акцептора электронов, так и при внесении элементной серы, нитрита, нитрата, сульфата, тиосульфата, фумарата. Таким образом, штамм GM2012 являлся облигатным аэробом.

Полученная сборка генома штамма GM2012 имела размер 6.76 млн п.о. и состояла из 113 контигов. Доля Г+Ц составляла 70.1 мол.%. Последовательность гена 16S pPHK штамма GM2012 имела 88-89% сходства с родами, входящими в семейство *Isosphaeraceae*. Для определения точного филогенетического положения штамма GM2012 был проведен филогенетический анализ, основанный на сравнении последовательностей гена 16S pPHK и аминокислотных последовательностей 120 консервативных белков (bac120). Оба филогенетических дерева показали схожую топологию (рис. 2): штамм GM2012 находился около корня семейства *Isosphaeraceae* и представлял новый род.



**Рисунок 2.** Филогенетическое дерево, основанное на сравнении 120 консервативных белков, построенное методом максимального правдоподобия и показывающее положение штамма GM2012 (выделен жирным шрифтом) по отношению к другим представителям класса *Planctomycetia* (серым сектором отмечены представители *Isosphaeraceae*).

Для функционального анализа генома штамма GM2012 каждый белок-кодирующий ген был отнесен к определенному GOG. Всего 3104 из 4921 *in silico* транслированных генов были отнесены к 1482 COGs, при этом ~50% составляли белки с неизвестной или ненадежно предсказанной функцией (категории S и R). Кроме того, одной из самых многочисленных категорий являлась категория G (метаболизм и транспорт углеводов), к которой был отнесен 191 белок, что четко коррелирует с данными, полученными в ходе ростовых экспериментов.

Основываясь на филогенетическом анализе, геномном сравнении и фенотипических свойствах (условия роста и спектр утилизируемых субстратов, Табл. 2), мы описали штамм GM2012 как представителя нового рода и вида в семействе *Isosphaeraceae – Tautonia sociabilis*.

### Описание Tautonia gen. nov.

Грамотрицательные неподвижные кокки, встречаются в виде одиночных клеток или бесформенных скоплений. Размножаются почкованием. Облигатный аэроб. Термотолерантный. Нейтрофил. Органотроф, растущий на моно-, ДИполисахаридах. Основные жирные кислоты – С16:0, С18:1ω9 и С18:0. Представитель филума Planctomycetes (порядок Isosophaerales, семейство Isosphaeraceae). Типовым вилом является Tautonia sociabilis.

### Описание *Tautonia sociabilis* sp.nov.

Клетки 1.7–2.9 мкм в диаметре. Растет при 37–46°C с оптимумом 42°C. Диапазон значений рН для роста составлял 5.5–9.0 с оптимумом 7.5–7.7. Растет аэробно с ксилозой, глюкозой, маннозой, галактозой, мальтозой, лактозой, трегалозой, декстрином, крахмалом или ксантановой камедью в качестве единственного источника углерода и энергии. Устойчив к пенициллину, ампициллину, амоксициллину и стрептомицину; чувствителен к канамицину, полимиксину,

ванкомицину и хлорамфениколу. Доля  $\Gamma$ +Ц в генома составляет 70.1 мол. %. Типовой штамм,  $GM2012^T$  (=VKM B-2860, =KCTC 72013), выделен из золотодобывающей шахты ТауТона (ЮАР). Номер генома в базе данных NCBI GenBank — RYZH00000000.

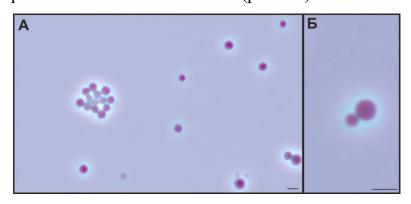
T ( ) (					7 1
Таблица 7 (п	авнительная характе	пистика типовы	у вилов кажлого	пола в семеистве и	sasnhaeraceae
таолица 2. Ср	авин слвиал ларакте	pherma imiobbi	а видов каждого	рода в семенетье і	sospinici accac.

Свойство	1	2	3	4	5	6
Температура	37/42/46	34/41/51	4/20-26/33	10/30-35/35	6/15-25/30	4/15-22/28
(мин/опт/макс)						
pН	5.5/7.5-	нд/7.8-	4.2/5.0-6.2/7.5	6.5/7.5-	3.5/5.0-5.5/6.5	4.5/5.5-
(мин/опт/макс)	7.7/9.0	8.8/нд		8.5/9.5		6.0/6.8
NaCl	0/0/3%	нд	0/0/0.5%	0/0/0.25%	0/0/0.5%	0/0/0.1%
(мин/опт/макс)						
Жирные	C18:1ω9c,	нд	C18:1ω9c,	С18:1ω9с и	C18:1ω9c,	C18:1ω9c,
кислоты	С18:0 и		С16:0 и	C16:0	С18:0 и	С16:0 и
	C16:0		C18:2\omega6c,12c		C16:0	C14:0
Г+Ц, мол. %	70.1	66.2	59.9	70	66	61.2-62.2
Ксилоза	+	нд	+	-	+	+
Фруктоза	-	-	+	+	+	+
Сахароза	-	нд	+	+	+	+
Трегалоза	+	нд	+	+	+	+
Раффиноза	-	нд	-	-	+	=
Целлобиоза	-	нд	+	+	+	+
Крахмал	+	нд	-	+	-	+
Пектин	-	нд	+	нд	+	-
Ксилан	-	нд	+	-	+	+
Ксантановая	+	нд	нд	нд	нд	+
камедь						

<sup>1 —</sup> **штамм GM2012**, 2 — *Isosphaera* (Giovannoni et al., 1987), 3 — *Singulisphaera* (Kulichevskaya et al., 2008), 4 — *Aquisphaera* (Bondoso et al., 2011), 5 — *Paludisphaera* (Kulichevskaya et al., 2016; Ivanova et al., 2017), 6 — *Tundrisphaera* (Kulichevskaya et al., 2017); нд — нет данных

### 2.2. Описание штамма 2918 в качестве нового рода и вида Thermogemmata fonticola

Клетки штамма 2918 представляли собой подвижные кокки, 1-2 мкм в диаметре, встречающиеся в виде одиночных клеток, пар или небольших скоплений (рис. 3A); размножаются почкованием (рис. 3Б).



**Рисунок 3.** Морфология клеток штамма 2918 клеток под световым микроскопом: A — общий вид, B — почкующиеся клетки. Масштаб 2 мкм.

Штамм 2918 рос в диапазоне температур от  $25^{\circ}$ С до  $60^{\circ}$ С и значениях pH от 5.0-8.0. Рост отсутствовал при температуре  $14^{\circ}$ С и ниже, и при  $65^{\circ}$ С и выше, а также при значениях pH 4.5 и ниже, и pH 8.5 и выше. Оптимальными условиями роста были 54- $60^{\circ}$ С и pH 7.5. Изолят являлся нейтрофилом и умеренным термофилом. Штамм 2918

являлся хемоорганогетеротрофом и в аэробных условиях использовал широкий спектр углеводов в качестве субстратов: ксилоза, глюкоза, манноза, мальтоза, сахароза, лактоза, целлобиоза, крахмал, лихенан, галактан, арабинан или ксантановая камедь. Он был способен метаболизировать раффинозу, не ксилан, пектин, карбоксиметилцеллюлозу, ксилоглюкан, маннан, глюкоманнан и пуллулан. В то же время в анаэробных условиях мальтоза не использовалась ни при добавлении элементной серы, нитрата или тиосульфата в качестве внешних акцепторов электронов, ни без добавления внешнего акцептора (брожение).

Поиск ближайших гомологов гена 16S pPHK штамма 2918 с использованием BLAST показал, что он относится к семейству Gemmataceae: самый высокий процент сходства наблюдался между штаммом 2918 и Gemmata obscuriglobus DSM 5831 — 90.35%. Для определения точного положения изолята в семействе был проведен филогенетический анализ, основанный на сравнении последовательностей гена 16S pPHK и аминокислотных последовательностей 120 консервативных белков (bac120). Оба подхода продемонстрировали, что штамм 2918 располагался на ветви, удаленной от других представителей семейства Gemmataceae, и представлял новый таксон уровня рода (рис. 4).

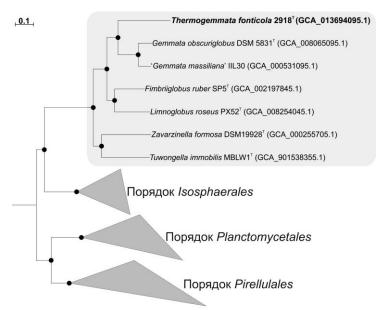
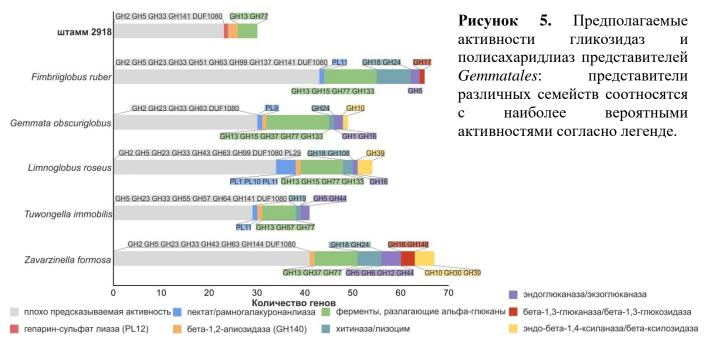


Рисунок 4. Филогенетическое дерево, основанное на сравнении 120 консервативных белков, построенное методом максимального правдоподобия, показывающее положение штамма 2918 (выделен жирным шрифтом) по отношению к другим представителям класса *Planctomycetia* (серым сектором отмечены представители *Gemmataceae*).

Геном штамма 2918 обладал наименьшим размером по сравнению с другими представителями Gemmatales — 4.8 млн п.о. Такая тенденция отмечается и для геномов других термофилов, размеры которых в целом меньше, чем у их мезофильных родственников (Zhaxybayeva et al., 2012). Распределение коровых и уникальных белков по функциональным категориям СОС позволило увидеть общую картину функциональных особенностей Gemmatales. Сравнение представленности СОС категорий среди коровых и уникальных белков показало, что категории Е (метаболизм аминокислот), F (метаболизм нуклеотидов), G (метаболизм углеводов), H (метаболизм кофакторов) и J (трансляция) были перепредставлены в коровой части генома, что соответствует универсальности функций данных категорий, которые необходимы для поддержания жизнедеятельности клеток. Среди уникальных множество белков относилось к категориям L (репликация и репарация), N (клеточная подвижность), Т (сигналинг), а также R и S (неизвестные или плохо предсказываемые функции).

Можно предположить, что эти белки отвечают за специфические адаптации к конкретной эконише.

Все культивируемые представители порядка Gemmatales могут использовать разнообразные полисахариды и обладают множеством ферментов, участвующих в разложении полисахаридов (CAZymes). В геноме штамма 2918 было обнаружено 111 генов CAZymes что позволило предсказать возможные пути гидролиза полисахаридов у этого штамма. Крахмал может быть гидролизован рядом ферментов из семейств GH13, GH77 и GT35 (рис. 5). Ксантановая камедь, вероятно, метаболизируется под действием белков, содержащих домен с неизвестной функцией DUF1080 и гликозидаз из семейств GH2 и GH5. Дальние гомологи гликозидаз GH33 могли отвечать за деградацию арабинана, так как GH33 является родственным семейству GH93 (экзоальфа-арабиназы). Гены ферментов, отвечающие за гидролиз галактана, лихенана и бета-глюкана не были обнаружены, однако в геноме закодированы предполагаемые гликозидазы, для которых не удалось найти близких охарактеризованных гомологов и которые, возможно, проявляют галактаназную и бета-глюканазную активности MBA2227215, MBA2225363, MBA2225677, (MBA2224662, MBA2225809). Функциональный анализ генов гликозидаз и полисахаридлиаз, найденных в геномах других Gemmatales, показал, что гены ферментов, участвующих в гидролизе альфаглюканов (крахмал, декстрин, трегалоза), а именно, семейств GH13, GH15, GH37, GH57, GH77 или GH133 – находились во всех исследованных геномах. Другая общая тенденция – большое количество гликозидаз и полисахаридлиаз (GH2, GH5, GH23, GH33, GH43, GH51, GH55, GH63, GH64, GH99, GH141, GH144, PL29) с плохо предсказываемыми активностями (более половины от общего количества). В геномах Fimbriiglobus ruber и Zavarzinella formosa закодировано большое количество ферментов, участвующих в разложении хитина – GH18 и GH24. Limnoglobus roseus показывал пектинолитический потенциал благодаря большому набору пектатлиаз и рамногалатуронанлиаз из семейств PL1, PL10 и PL11. В геноме Zavarzinella formosa DSM19828 было обнаружено множество генов ферментов, активных по отношению к глюканам, содержащим бета-1,4-связи (семейства GH5, GH6, GH12 и GH144), и ксилану (семейства GH10, GH30 и GH39).



На основании филогенетического анализа, данных хемотаксономии и сравнения фенотипических характеристик (диапазоны температуры и рН, используемые субстраты, Табл. 3), мы описали штамм 2918 как новый род в семействе *Gemmataceae – Thermogemmata fonticola*.

### Описание Thermogemmata gen. nov.

Грамотрицательные клетки сферической формы размножаются почкованием. Строгий аэроб. Умеренный термофил. Нейтрофил. Обладает хемоорганотрофным метаболизмом. Основные жирные кислоты C18:0 и C20:0. Основной хинон МК6. Представитель филума *Planctomycetes* (порядок *Gemmatales*, семейство *Gemmatacaea*). Типовым видом является *Thermogemmata fonticola*.

### Описание *Thermogemmata fonticola* sp.nov.

Подвижные клетки 1-2 мкм в диаметре, встречаются одиночно, в парах и в виде скоплений. Диапазон температур роста составляет 25–60°С с оптимумом 54–60°С. Диапазон значений рН для роста составляет 5.0-8.0 с оптимумом 7.5. Растет на ксилозе, глюкозе, маннозе, мальтозе, лактозе, сахарозе, целлобиозе, трегалозе, крахмале, лихенане, галактане, арабинане, ксантане или бета-глюкане. Устойчив к ампициллину, стрептомицину и ванкомицину; чувствителен к канамицину, полимиксину и новобиоцину. Типовой штамм 2918<sup>Т</sup> (=VKM B-3161, =KCTC 72012) был выделен из горячего источника около реки Карымша, Камчатка (Россия). Номер генома в базе данных NCBI GenBank – JACEFB0000000000.

Таблица 3. Сравнительная характеристика типовых видов типовых видов каждого рода в семействе *Gemmataceae*.

Gemmanaceae.								
Характеристика	1	2	3	4	5	6	7	8
Подвижность	+	+	+	-	-	+	-	+
Розетки	-	-	+	-	+	+	-	-
Температура	25/54-60/60	16/нд/35	10/20-25/30	10/20-25/30	6/20-26/30	10/20-25/30	20/32-36/40	4/15-22/28
(мин/опт/макс)								
pН	5.0/7.5/8.0	7.8/нд/8.8	5.0/6.5/7.5	4.0/5.5-	4.0/5.0-	3.8/5.5-	6.0/7.5-	4.2/5.0-
(мин/опт/макс)				6.0/6.8	5.5/7.0	6.0/7.2	8.0/10.5	5.5/6.8
Соленость	0/0/0.5	0/0/0.6	0/0/0.5	0/0/0.1	0/0/<0.1	0/0/0.6	0/0/0.4	0/0/0.5
(мин/опт/макс)								
Сахароза	+	+	+	+	+	+	ı	+
Ксилоза	+	+	+	+	+	+	-	+
Лактоза	+	+	+	+	-	+	нд	+
Манноза	+	+	+	+	+	-	нд	+
Раффиноза	-	-	+	+	+	+	нд	-
Ксилан	-	+	+	+	+	+	нд	+
Пектин	-	+	+	-	-	+	нд	-
КМЦ	-	-	-	-	+	-	нд	+
Ксантановая	+	нд	+	+	нд	нд	нд	+
камедь								
Г+Ц, мол. %	60.4	64-67.2	65.6	60.7	58.5	62.5	57	67.4
Основные	$C_{18:0}; C_{20:0}$	C <sub>18:0</sub> ; C <sub>16:1</sub>	$C_{18:1} \omega 7;$	$C_{20:1} \omega 9;$	$C_{16:1} \omega 5;$	$C_{18:1} \omega 5;$	$C_{16:1} \omega 5;$	C <sub>18:0</sub> ;βOH-
жирные		ω 5c	$C_{18:0}$	$C_{16:0}$	$C_{18:1} \omega 5$	$C_{16:1} \omega 5$	$C_{16:0}$	$C_{16:1}; C_{16:1} \omega$
кислоты								5c
Хиноны	MK-6	нд	MK-6	MK-6	нд	MK-6	нд	нд
Размер генома	4.81	9.0	9.38	12.36	нд	10.09	6.69	9.83
1 wrays 2018: 2 Cammata (Franzmann and Skarman 1084: Kulichayskaya et al. 2000): 3 Limnadahus (K								a (Vuliabovala

<sup>1 —</sup> штамм 2918; 2 — Gemmata (Franzmann and Skerman, 1984; Kulichevskaya et al., 2009); 3 — Limnoglobus (Kulichevskaya et al., 2020b); 4 - Fimbriiglobus (Kulichevskaya et al., 2017); 5 — Telmatocola (Kulichevskaya et al., 2012); 6 - Zavarzinella (Kulichevskaya et al., 2009); 7 - Tuwongella (Seeger et al., 2017); 8 - Frigoriglobus (Kulichevskaya et al., 2020). нд — нет данных

### 3. In silico реконструкция метаболизма Thermogutta terrifontis R1 с использованием геномики и транскриптомики

### 3.1. Общие характеристики генома и транскриптомов Thermogutta terrifontis

Для реконструкции путей гидролиза полисахаридов и центрального метаболизма *Thermogutta terrifontis* были секвенированы и проанализированы геном и транскриптомы, полученные при культивировании клеток с ксантановой камедью и трегалозой. Геном был собран в кольцевую хромосому, имел размер 4.81 млн п.о., доля Г+Ц составляла 57.34 мол. %. Всего в геноме было обнаружено 4504 белок-кодирующих генов. Транскриптомный анализ показал, что 665 генов имели повышенную экспрессию, а 617 генов — пониженную экспрессию в клетках, выращенных на ксантановой камеди, по сравнению с клетками, выращенными на трегалозе.

### 3.2. Анализ генома Thermogutta terrifontis

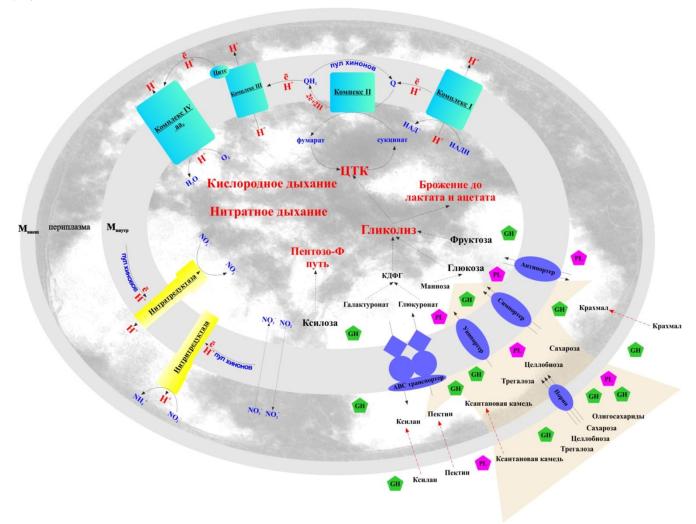
Поиск генов CAZymes показал, что геном T. terrifontis R1 содержит 101 ген гликозидаз, 14 генов полисахаридлиаз и 3 гена карбогидратэстераз. Для 54-х из них была предсказана внеклеточная локализация. Наиболее многочисленными были белки из семейства GH5 (10 белков) и предполагаемые гликозидазы, содержащие домен DUF1080 (9 белков). Детальный анализ специфичности CAZymes позволил выявить пути гидролиза некоторых полисахаридов. Альфа-1,4- и альфа-1,6,-гликозидные связи в крахмале могли гидролизоваться за счет ряда гликозидаз из семейств GH13 и GH77 с образованием мальтоолигосахаридов и глюкозы. Ксилан мог разлагаться до ксилоолигосахаридов за счет действия эндоксиланаз (GH10) и ксилозы – за счет действия бета-ксилозидаз (GH39). Разложение пектина происходило, скорее всего, под действием пектатлиазы (PL10) И нескольких полигалактуроназ (GH28) высвобождением D-галактуроновой кислоты.

Основные продукты гидролиза полисахаридов представлены маннозой, ксилозой, галактуроновой и глюкуроновой Дальнейшее окисление D-глюкозы и D-фруктозы происходит за счет гликолиза (рис. 6, 7А). Примечательно, что в геноме содержались гены как АТФ-зависимой фосфофруктокиназы, так и РР<sub>і</sub>-зависимых. Предполагается, что РР<sub>і</sub>-зависимые фосфофруктокиназы участвовали в глюконеогенезе и пентозо-фосфатном пути. Ксилоза изомеризовалась до ксилулозы под действием ксилозоизомеразы; далее ксилулокиназа фосфорилировала ксилулозу до ксилулозо-5-Ф, который поступал в пентозо-фосфатный путь. За исключением гена трансальдолазы в геноме штамма R1 были обнаружены все гены, кодирующие ферменты этого пути. Образующаяся в результате работы транскетолазы седогептулозо-7-Ф могла быть фосфорилирована PP<sub>i</sub>-зависимыми фосфофруктокиназами. Далее седогептулозо-1,7-бисФ расщеплялась до эритрозо-4- $\Phi$  и ДГА $\Phi$  за счет работы фруктозо-1,6-бис $\Phi$ -альдолазы. Все гены, кодирующие ферменты ЦТК, были обнаружены в геноме *T. terrifontis* R1.

Водород, образующийся при брожении, являлся продуктом действия [NiFe]-гидрогеназы и [FeFe]-гидрогеназ.

Была обнаружена полная, действующая в аэробных условиях ЭТЦ, включающая НАДН-дегидрогеназный комплекс, сукцинатдегидрогеназный комплекс, цитохромов  $b/c_1$  и терминальную цитохром с оксидазу  $aa_3$ -типа (рис. 6).

Нитратредукция у T. terrifontis происходила при работе двух ферментативных комплексов (рис. 6). Первая стадия осуществляется за счет цитоплазматической нитратредуктазы Nar, все гены которой были найдены в геноме штамма R1: narG,  $narH\ u\ narI$ . Комплекс цитохромов  $b/c_1$ , гены которого расположены очень близко к генам narGHI, также возможно вовлечен в перенос электронов и экспорт протонов в процессе анаэробного роста T. terrifontis с нитратом в качестве внешнего акцептора электронов. Нитрит, образуемый нитратредуктазой Nar, восстанавливается до аммония под действием периплазматической мембран-связанной нитритредуктазы Nrf.



**Рисунок 6.** Реконструкция катаболизма углеводов, ЭТЦ, терминальных оксидоредуктаз:  $M_{\text{внеш}}$  – внешняя мембрана;  $M_{\text{внутр}}$  – внутренняя мембрана; КДФГ – 2-кето-3-дезоксифосфо-глюконат; Цит с – цитохром c; GH – гликозидазы; PL – полисахаридлиазы

### 3.3. Транскриптомный анализ Thermogutta terrifontis

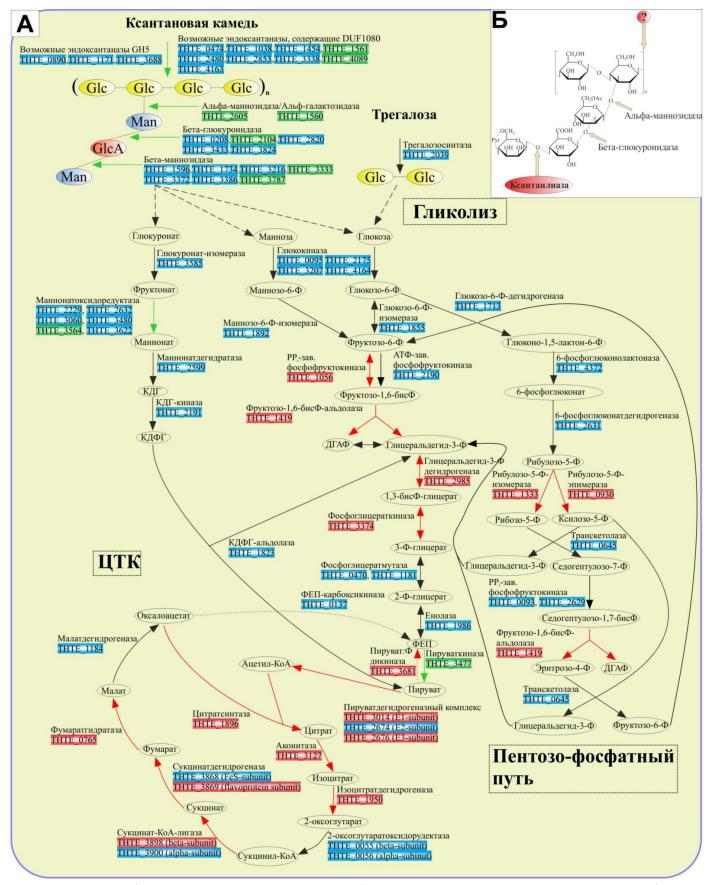
Для того чтобы понять механизм деградации ксантановой камеди были проанализированы транскриптомы клеток T. terrifontis, выращенных на данном субстрате и трегалозе (в качестве контроля).

Разложение трегалозы, скорее всего, происходило под действием трегалозосинтазы из GT4 (рис. 7A), осуществляющей обратную реакцию. Уровень экспрессии гена *THTE\_2039* был одинаков в культурах, выращенных на ксантановой камеди и трегалозе, что может быть объяснено разнонаправленным действием фермента при разных условиях роста.

Большинство генов, кодирующих ферменты центрального катаболизма сахаров, имели либо одинаковый уровень экспрессии на ксантановой камеди и трегалозе, либо пониженную экспрессию в клетках, выращенных на ксантановой камеди. Это может быть связано с тем, что трегалоза требует намного меньше реакций для полного расщепления: одна ферментативная реакция и перенос внутрь клетки против многоступенчатого расщепления ксантановой камеди. Соответственно, при росте на трегалозе, как более простом субстрате, повышена экспрессия генов ферментов, участвующих в дальнейших реакциях ее катаболизма.

Для полного гидролиза ксантановой камеди необходимо разрушить следующие гликозидные связи: бета-манноза- $1 \rightarrow 4$ -альфа-глюкуронат, бета-глюкуронат- $1 \rightarrow 2$ альфа-манноза, альфа-манноза-1→3-бета-глюкоза в боковых цепях и бета-1,4гликозидные связи в основной цепи. Ферментов, вовлеченных в разложение ксантановой камеди известно крайне мало: ксантанлиазы из семейства PL8, альфаманнозидазы из семейства GH38, бета-глюкуронидазы и ксантан-специфичная эндоглюканаза, последовательность которой, однако, неизвестна. В геноме Т. terrifontis не было обнаружено генов полисахаридлиаз из семейства PL8. Возможно, вместо них действуют эндоманнаназы/бета-маннозидазы из семейства расщепляющие связь Man(1β-4α)GlcA. Транскриптомный анализ показал, что гены двух из них имели повышенную экспрессию при росте клеток штамма R1 на ксантановой камеди, что указывает на их возможное участие в ее деструкции. Для расщепления связи GlcA(β1-2α)Man необходимы бета-глюкуронидазы, известные представители которых относятся к семействам GH1, GH2, GH30 и GH79. Пять генов, кодирующих ферменты из GH2, были обнаружены в геноме штамма R1: один из них (ТНТЕ\_2104) имел повышенную экспрессию на ксантановой камеди, поэтому мы предполагаем, что, ПО крайней мере, продукт этого гена является бетаглюкуронидазой, задействованной в разложении ксантановой камеди. Связь Мап(1αβ3)Glc гидролизуется альфа-маннозидазой из семейства GH38 (THTE\_2605) и, возможно, внеклеточной альфа-галактозидазой из семейства GH36 (ТНТЕ 1560). Оба гена имели повышенный уровень экспрессии при культивировании штамма с ксантановой камедью. Основная же цепь, звенья которой связаны связями Glc(β1-4)Glc, может расщепляться гликозидазами из семейства GH5, однако ни один из генов штамма R1, кодирующих эти гликозидазы, не имел повышенной экспрессии на ксантановой камеди. Однако было обнаружено 9 генов потенциальных гликозидаз, содержащих домен с неизвестными функциями DUF1080. Два из них, THTE 1561 and ТНТЕ\_4089, имели сверхэкспрессию при выращивании клеток с ксантановой камедью. Такое количество генов, кодирующих предполагаемые гликозидазы, в ксантан-разлагающем микроорганизме, может отражать их роль в процессе гидролиза основной цепи (рис. 7A). Кроме того, примечательно, что DUF1080-содержащие белки крайне многочисленны у многих других Planctomycetes (и некоторых других представителей PVC суперфилума), что отличает их от других бактерий.

Таким образом, на основании геномного и транскриптомного анализов, нами был предложен новый путь утилизации ксантановой камеди, который действует у T. terrifontis (рис. 7A) и отличается от известного для других бактерий пути по набору участвующих в нем ферментов (рис. 7Б): в пути T. terrifontis вместо ксантанлиазы действует бета-маннозидаза (GH5), а в качестве эндоксантаназ действуют белки, содержащие DUF1080.



**Рисунок 7.** А — ферменты, вовлеченные в метаболизм сахаров у *Т. terrifontis*. Цветные фигуры отражают дифференциальную экспрессию генов согласно транскриптомному анализу: зеленые — гены, имеющие повышенную экспрессию при культивировании с ксантановой камедью, красные — гены, имеющие пониженную экспрессию при культивировании с ксантановой камедью, синие — гены имели одинаковый уровень экспрессии. Б — известный для других бактерий путь деструкции ксантановой камедь (с участием ксантанлиазы).

### 4. Анализ метаболизма представителей класса *Phycisphaerae* с использованием сравнительной геномики

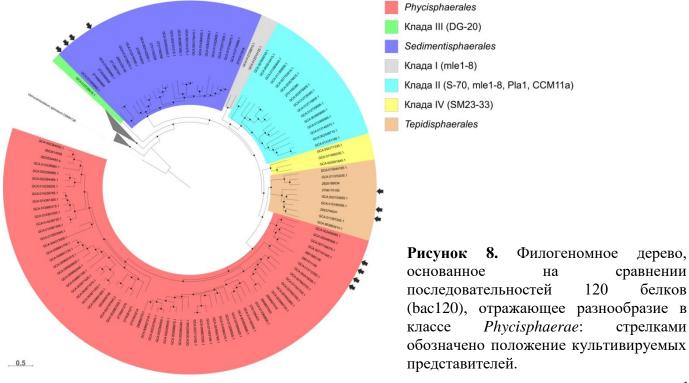
### **4.1.** Разнообразие геномов *Phycisphaerae*

На данный момент в классе *Phycisphaerae* известно лишь 10 культивируемых видов, что свидетельствует о его крайне слабой изученности. В связи с этим с целью понимания метаболических возможностей представителей этого класса нами был проведен их сравнительный геномный анализ.

Нами был секвенирован и собран в хромосому геном *Tepidisphaera mucosa* 2842, первого термофильного представителя *Phycisphaerae*. Геном имел размер 3.43 млн п.о., доля Г+Ц составляла 53.47 мол. %.; в геноме было обнаружено 2988 белок-кодирующих генов, из которых 734 (24%) генов имели неизвестную функцию.

Были отобраны все геномы (в том числе МАGи) *Planctomycetes*, отнесенные к *Phycipshaerae*, а также неклассифицированные геномы из баз данных GenBank и IMG, для более полного сравнительного анализа. После нескольких этапов фильтрации (исключение некачественных и почти идентичных сборок, филогенетический анализ) были отобраны 120 геномов, которые являются репрезентативной выборкой, представляющей весь класс. Общие характеристики геномов сильно варьировали: размеры геномов составляли от 1.8 до 7.2 млн п.о. а Г+Ц состав – от 41 до 73%. Это объяснимо, так как геномы были получены из образцов, отобранных в различных экосистемах: морские и пресные водоемы, почва, гиперсоленые отложения, горячие источники и другие. Для геномов, полученных из термальных экосистем, можно отметить средний размер геномов (2.46-5.54 млн п.о.) и повышенный Г+Ц состав (53.5-72.4%).

Проведенный филогеномный анализ показал, что выбранные геномы можно разделить на семь глубоких групп уровня порядка (рис. 8), включающие от 1 (DG20) до 65 (*Phycisphaerales*) геномов. Стоит отметить, что на данный момент культивируемые представители известны лишь в трех порядках: *Phycisphaerales*, *Sedimentisphaerales* и *Tepidisphaerales*.

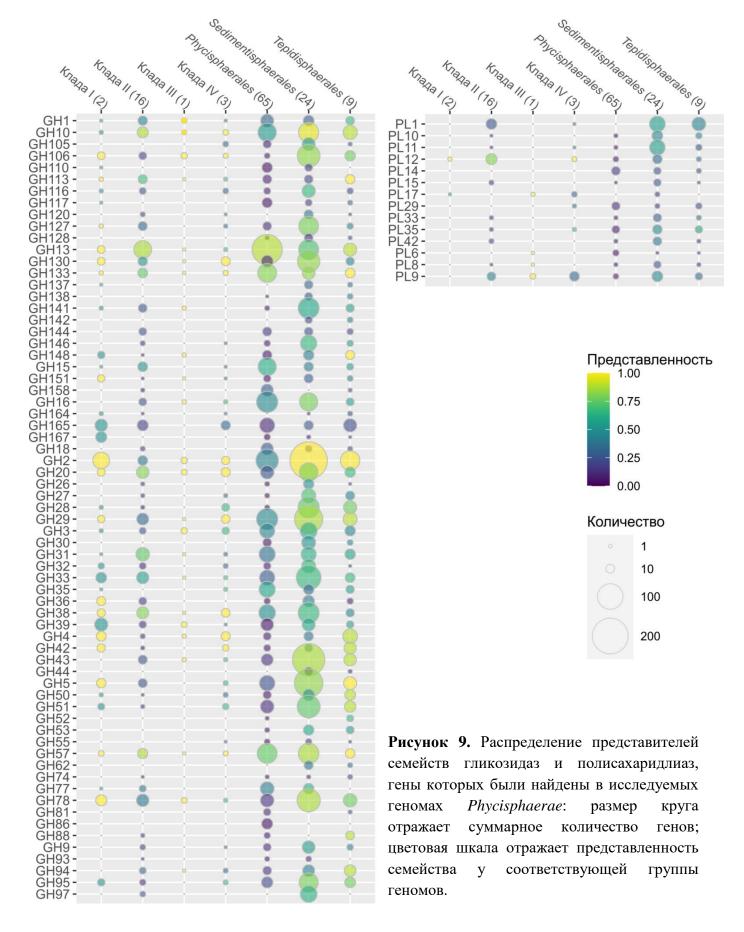


### 4.2. Сравнительный анализ метаболизма представителей Phycisphaerae

Для оценки сходства метаболических характеристик разных групп в классе *Phycisphaerae* была проведена NMDS (неметрическое многомерное шкалирование) кластеризация геномов на основании общего набора COG: геномы представителей порядков *Sedimentisphaerales*, *Phycisphaerales* и группы SM23-33 кластеризовались достаточно компактно, что говорит об общности метаболизма в пределах этих групп. В то же время геномы *Tepidisphaerales* и Клады II не показали четкой кластеризации, что может быть вызвано большим разнообразием метаболизма в соответствующих кластерах или недостаточным количеством доступных геномов.

Все культивируемые организмы, относящиеся к классу Phycisphaerae, являются полисахаридолитиками, в связи с чем в их геномах был проведен поиск генов ферментов, участвующих в разложении полисахаридов. Количество генов гликозидаз (GH) и полисахаридлиаз (PL) сильно варьировало от генома к геному: от 1 (порядок Phycisphaerales) до 285 (Клада I (mle1-8)). Самые значительные наборы наблюдали в порядках Tepidisphaerales и Sedimentisphaerales, при этом полисахаридлиаз во всех случаях было меньше, чем гликозидаз. Наименьшее количество генов было обнаружено в геномах, относящихся к *Phycisphaerales*, что подразумевает меньшую В разлагаемых ИМИ полисахаридов. спектре дополнительный анализ представленности различных семейств гликозидаз полисахаридлиаз (рис. 9). Самыми массовыми семействами были GH2, GH13, GH29, GH43, GH5, GH33, GH78, GH10, GH57, GH38, GH16, GH20, GH130, GH51, GH106, GH165, GH31, GH3, GH133, GH28, GH95. Ферменты из семейства GH13, GH57, GH133 отвечают за гидролиз глюканов с альфа-связями (крахмал, декстрин, пуллулан). Среди представителей GH43 и GH51 можно обнаружить эндо-альфаарабиназы и альфа-арабинозидазы, что позволяет их обладателям использовать арабинан, также арабинозы, И отщеплять остатки содержащиеся гетерополисахаридах. Гидролиз основных компонентов клеточных стенок растений – целлюлозы, ксилана, ксилоглюкана – осуществляют ферменты семейств GH3, GH5, GH10 и GH16. Семейство гликозидаз GH28 отвечает за разложение пектина. Самые представленные у Tepidisphaerales семейства CAZymes сходны с таковыми у «обобщенного» представителя Phycisphaerae: GH2, GH4, GH10, GH29, GH78, GH165, GH28, GH13, GH5, GH43, GH42, GH94, GH51, GH50 и PL1. Что касается отличий, то у Tepidisphaerales было обнаружено относительно больше генов GH4, GH42, GH94, GH50, а также PL1 (пектатлиазы).

В геноме *Tepidisphaera mucosa* 2842 было обнаружено 158 генов CAZymes: 65 генов гликозидаз, 20 генов полисахаридлиаз, 13 генов углеводострераз, 2 гена углеводоксидаз, а также гликозил-трансферазы. Выявленный набор CAZymes позволяет *Т. mucosa* утилизовать широкий спектр полисахаридов, в том числе соединения, рост на которых не был показан ранее при описании данной бактерии. Так, оказалось, что штамм 2842 может расти на ксилоглюкане (за счет наличия генов ксилоглюканазы (GH5), бета-галактозидаз (GH2), альфа-фукозидаз (GH29) и альфа-галактозидазы (GH4)) и галактане (за счет работы эндо-бета-1,4-галактаназы (GH53) и бета-галактозидаз (GH2)). Предсказанное использование данных субстратов этим штаммом было нами подтверждено с помощью ростовых экспериментов.



Реконструкция путей центрального метаболизма сахаров, брожения и аэробного дыхания (рис. 10) выявила, что в геноме единственного представителя Клады III (DG-20) были обнаружены гены, кодирующие некоторые комплексы аэробного дыхания,

однако не было найдено генов терминальных цитохром-оксидаз или хинол-оксидаз. Вероятно, этот организм способен бродить с образованием ацетата и водорода.

В свою очередь, почти у всех представителей *Sedimentisphaerales* комплексы аэробного дыхания полностью отсутствовали. Также у всех были найдены гены, кодирующие ферменты, участвующие в разных типах брожения. Это согласуется с тем, что все культивируемые представители этого порядка — облигатные анаэробы (Spring et al., 2018).

Наборы генов в двух геномах, относящихся к Кладе I (mle1-8), несколько различались между собой: только в одном были найдены гены НАДН-дегидрогеназы, альтернативного комплекса III, хинол-оксидазы и цитохром-оксидазы *аа3*. В обоих геномах присутствовали гены, кодирующие ацетил-фосфотрансферазу, ацетаткиназу, лактатдегидрогеназу и несколько гидрогеназ.

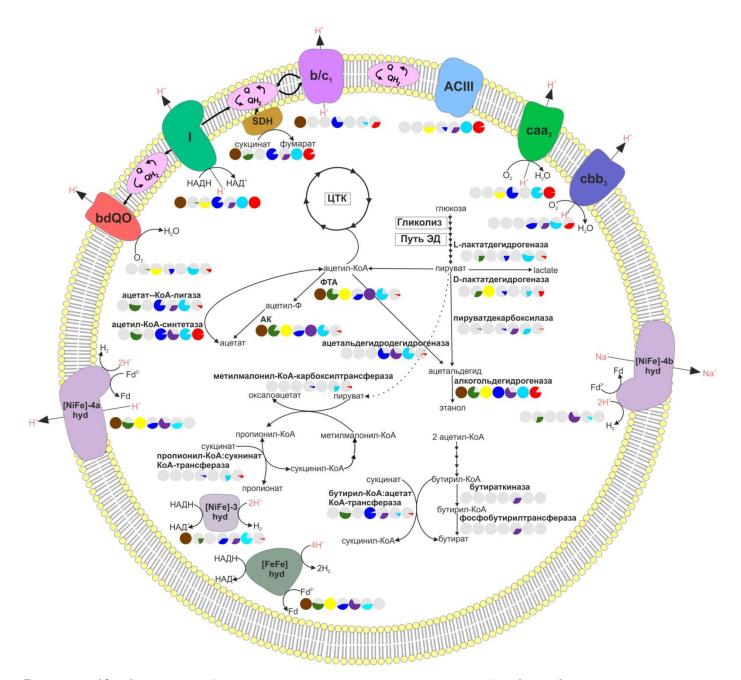
В геномах Клады II можно было обнаружить как гены различных комплексов аэробного дыхания (НАДН-дегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, b/c1-комплекс, альтернативный комплекс III, хинол-оксидаза, цитохром-оксидазы типов aa3 и bb3), так и гены ферментов брожения (пути с образованием ацетата, пропионата, бутирата, этанола и водорода).

В Кладе IV (SM23-33) также присутствовали факультативный анаэроб, обладающий комплексами аэробного дыхания (НАДН-хинон-оксидоредуктаза, альтернативный комплекс III и цитохром-оксидаза bb3) и ферментами брожения, и два облигатно анаэробных микроорганизма, которые, вероятно, могли только бродить с образованием ацетата, бутирата, этанола и водорода.

Геномный анализ порядка *Tepidisphaerales* указывает на факультативно анаэробный метаболизм его представителей, что подтвердилось ростовыми экспериментами для *Tepdisphaera mucosa* (Kovaleva et al., 2015) и "*Fontivita pretiosa*" (Podosokorskaya et al., submitted), однако не для "*Humisphaera borealis*", который был описан как микроаэрофил (Dedysh et al., 2021). В геномах представителей *Tepidisphaerales* были обнаружены как гены, кодирующие комплексы аэробного дыхания (НАДН-хинон-оксидоредуктаза, сукцинатдегидрогеназа, альтернативный комплекс III, хинол-оксидаза и цитохром-оксидазы двух типов), так и гены ферментов, отвечающих за различные типы брожения: образование ацетата, пропионата, лактата, этанола и водорода.

Представители порядка *Phycisphaerales* показывают сходные с *Tepidisphaerales* паттерны генов аэробного дыхания, но при этом у них было найдено меньше генов, отвечающих за брожение.

Суммируя все полученные результаты, можно утверждать, что в классе *Phycisphaerae* существуют две метаболические группы: 1) облигатные анаэробы, которые способны бродить (способность к анаэробному дыханию требует дополнительной проверки) и 2) факультативные анаэробы, которые могут как аэробно дышать, так и бродить.



**Рисунок 10.** Схема путей запасания энергии у представителей *Phycisphaerae*, основанная на проведенном геномном анализе: hyd – гидрогеназа, Q – хинон, bdQO – хинол-оксидаза bd-типа, I – НАДН-дегидрогеназный комплекс, SDH – сукцинатдегидрогеназа, ACIII – альтернативный комплекс III, caa3 – цитохром-оксидаза aa3-типа, cbb3 – цитохром-оксидаза bb3-типа, ЦТК – цикл трикарбоновых кислот, путь ЭД – путь Энтнера-Дудорова. Цветные круги обозначают процентное отношение геномов внутри каждой клады, у которых обнаружен данный ген: коричневый – Клада III (DG-20); зеленый – порядок Sedimentisphaerales; желтый – Клада I (mle1-8); синий – Клада II; фиолетовый – Клада IV (SM23-33); бирюзовый – порядок *Tepidisphaerales*; красный – порядок *Phycisphaerales*.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Планктомицеты часто выявляются в составе микробных сообществ термальных экосистем, однако обычно они представляют минорную часть сообщества. В ходе данной работы были подобраны селективные условия для выделения планктомицетов из горячих источников, позволяющие получить накопительные культуры, в которых планктомицеты составляют одну из доминирующих – вплоть до 74% – групп в сообществе. Благодаря этому удалось выделить ряд чистых культур, одна из которых представляет новый род в классе Phycisphaerae ("Fontivita pretiosa" B-254). Два штамма, GM2012 и 2918, были описаны как представители новых родов Tautonia sociabilis и Thermogemmata fonticola, соответственно, исходя из филогенетического и хемотаксономического анализов, а также их фенотипических свойств. Все они участвуют в разложении разнообразных полисахаридов, В первую ксантановой камеди и гемицеллюлоз, таких как ксилан, пектин, ксилоглюкан, арабинан, галактан. Гемицеллюлозы попадают в источники в составе отмерших остатков растений из окружающих территорий. В то же время рост на ксантановой камеди, присущий многим планктомицетам, указывает на их участие в разложении мертвых клеток других микроорганизмов, населяющих экосистемы.

С применением сравнительно-геномного анализа был детально исследован метаболизм двух выделенных ранее термофильных планктомицетов – Tepidisphaera mucosa 2842 и Thermogutta terrifontis R1. Были выявлены гены, кодирующие гидролиза полисахаридов, центральный катаболизм запасания энергии (брожение, аэробное и анаэробное дыхание). Для *Thermogutta* был детально in silico реконструирован весь процесс гидролиза полисахаридов, а также центральный метаболизм сахаров; предложен новый путь ксантановой камеди результатов разложения на основе геномного транскриптомного анализов. Был проведен сравнительно-геномный анализ 120 культивируемых и некультивируемых представителей Phycisphaerae. Было показано, что класс *Phycisphaerae* состоит, как минимум, из 7 монофилетических групп уровня порядка, которые, по всей видимости, сильно различаются метаболически. Во всех геномах были обнаружены гены CAZymes: количество гликозидаз и полисахаридлиаз варьировало от 1 до 285, что говорит о разной приспособленности этих организмов к представителей полисахаридах. У некоторых Sedimentisphaerales и частично группы mle1-8 и SM23-33) отсутствовала часть генов ЦТК и комплексов аэробного дыхания, с чем связана их неспособность к аэробному росту.

Таким образом, нам удалось охарактеризовать два новых рода планктомицетов из семейств *Isosphaeraceae* и *Gemmataceae*, обитающих в термальных экосистемах и играющих там роль первичных деструкторов органического вещества. Использование геномики и транскриптомики позволило предложить новый путь разложения ксантановой камеди; также сравнительно-геномный анализ позволил существенно расширить представления о гидролитической активности и центральном метаболизме сахаров и механизмах запасания энергии у представителей филума *Planctomycetes*.

### выводы

- 1. Охарактеризован новый род и вид планктомицетов, *Tautonia sociabilis* (семейство *Isosphaeraceae*). Типовой штамм нового вида, GM2012, выделенный из золотодобывающей шахты ТауТона (ЮАР), оптимально растет при 42°С и использует в качестве субстратов углеводы, в том числе ксантановую камедь и крахмал.
- 2. На основании изучения характеристик штамма 2918, выделенного из горячего источника около р. Карымша (Камчатка, Россия), описан новый род и вид термофильных планктомицетов, *Thermogemmata fonticola* (семейство *Gemmataceae*). Представитель нового таксона оптимально растет при 54-60°С и использует в качестве субстратов моно- и полисахариды, в том числе ксантановую камедь, арабинан, галактан, крахмал, лихенан и бета-глюкан.
- 3. Анализ генома *Thermogutta terrifontis* R1 позволил раскрыть широкие возможности гидролиза полисахаридов этой бактерией. Центральный катаболизм моносахаридов включает в себя гликолиз, модифицированный пентозо-фосфатный путь и цикл трикарбоновых кислот. Запасание энергии происходит за счет: 1) кислородного дыхания в аэробных условиях, 2) нитратного дыхания в анаэробных условиях при наличии нитрата и 3) брожения в анаэробных условиях при отсутствии внешнего акцептора электронов.
- 4. На основании результатов геномного и транскриптомного анализов предложен новый путь деструкции ксантановой камеди у *Thermogutta terrifontis* R1. Ключевой особенностью пути является участие белков, содержащих домен с неопределенной функцией DUF1080, гены которых перепредставлены в геномах многих представителей *Planctomycetes*.
- 5. Проанализирован набор генов *Tepidisphaera mucosa* 2842, кодирующих гликозидазы и полисахаридлиазы. Предсказана и экспериментально подтверждена способность *T. mucosa* расти на галактане и ксилоглюкане.
- 6. Показано, что класс *Phycisphaerae* представлен семью глубокими линиями уровня порядка, четыре из которых пока не содержат культивируемых представителей. Выявлено, что класс включает планктомицетов двух метаболических групп: 1) облигатные анаэробы, лишившиеся некоторых генов ЦТК и комплексов аэробного дыхания и 2) факультативные анаэробы, способные как к аэробному дыханию, так и к различным типам брожения.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

#### Статьи:

- 1. **Elcheninov A.G.**, Menzel P., Gudbergsdottir S.R., Slesarev A.I., Kadnikov V.V., Krogh A., Bonch-Osvolovskaya E.A., Peng X., Kublanov I.V. Sugar metabolism of the first thermophilic planctomycete *Thermogutta terrifontis*: Comparative genomic and transcriptomic approaches // Front. Microbiol. 2017. V. 8. 2140. doi: 10.3389/fmicb.2017.02140.
- 2. Bonch-Osmolovskaya E.A., **Elcheninov A.**, Zayulina K., Kublanov I.V. New thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities // Microbiol. Austral. 2018. V. 39. № 3. P. 122-125. doi: 10.1071/MA18038.
- 3. Kovaleva O.L., **Elcheninov A.G.**, Toshchakov S.V., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. *Tautonia sociabilis* gen. nov., sp. nov., a novel thermotolerant planctomycete, isolated from a 4000 m deep subterranean habitat // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. − 2019. − V. 69. − № 8. − P. 2299-2304. doi: 10.1099/ijsem.0.003467
- 4. **Elcheninov A.G.**, Podosokorskaya O.A., Kovaleva O.L., Novikov A.A., Toshchakov S.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. *Thermogemmata fonticola* gen. nov., sp. nov., the first thermophilic planctomycete of the order *Gemmatales* from a Kamchatka hot spring // Syst. Appl. Microbiol. − 2021. − V. 44. − № 1. − 126157. doi: 10.1016/j.syapm.2020.126157
- 5. Podosokorskaya O.A., **Elcheninov A.G.**, Novikov A.A., Kublanov I.V. *Fontivita pretiosa* gen. nov., sp. nov., the thermophilic planctomycete of the order *Tepidisphaerales* from a hot spring of Baikal lake region // Syst. Appl. Microbiol. 2022. (в печати).

### Тезисы конференций:

- 1. <u>Ельченинов А.Г.</u>, Ковалева О.Л., Тощаков С.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Кубланов И.В. Гидролитическая активность нового термофильного планктомицета *Tepidisphaera mucosa* // X молодежная школа-конференция с международным участием: «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, Россия, 27-30 октября 2015. Сборник тезисов. С. 65-67.
- 2. **Ельченинов А.Г.**, Menzel P., Gudbergsdottir S.R., Krogh A., Бонч-Осмоловская Е.А., Кубланов И.В. Анализ генома термофильного планктомицета *Thermogutta terrifontis* // V съезд биохимиков России, Сочи, Россия, 4-8 октября 2016. Acta Naturae научные труды, Т. 2, С. 207
- 3. Ельченинов А.Г., Menzel P., Gudbergsdottir S.R., Krogh A., Бонч-Осмоловская Е.А., Кубланов И.В. Реконструкция катаболизма углеводов термофильного представителя планктомицетов Thermogutta terrifontis c использованием транскриптомного геномного подходов // 1-й Российский И Микробиологический Конгресс, Россия, 17-18 октября Пущино, Материалы. С. 104-105.
- 4. <u>Elcheninov A.</u>, Toschakov S., Bonch-Osmolovskaya E., Kublanov I. Insights into metabolism of planctomycetes from *Phycisphaerae* class via comparative genomics // 8th Congress of European Microbiologists FEMS2019, Glasgow, UK, 7-11 July 2019. Abstract Book, P. 1287.