На правах рукописи

Руденко Татьяна Сергеевна

Новые аспекты диссимиляционного серного метаболизма *Beggiatoa leptomitoformis* и филогеномный анализ новых представителей семейства *Beggiatoaceae*

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва — 2026

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

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

Официальные оппоненты: **Каюмов Айрат Рашитович,**
доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой генетики, Институт фундаментальной медицины и биологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Тощаков Степан Владимирович,
кандидат биологических наук, начальник лаборатории «Геномная фабрика» Центра геномных исследований «Курчатовский геномный центр» Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук

Защита диссертации состоится «17» декабря 2026 г. в 11-00 на заседании диссертационного совета 24.1.233.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора 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, ФИЦ Биотехнологии РАН (117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп. 2) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН: https://www.fbras.ru/materialyi-k-zashhite-dissertatsii-rudenko-t-s.html.

Автореферат разослан «___» _____ 2026 года

Ученый секретарь диссертационного совета д.б.н., Хижняк Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Бесцветные сероокисляющие бактерии семейства *Beggiatoaceae*, относящиеся к типу *Pseudomonadota*, классу *Gammaproteobacteria*, являются одними из крупнейших прокариот. Представители семейства характеризуются значительным морфологическим разнообразием — от нитчатых трихомных форм до крупных сферических клеток *Thiomargarita namibiensis* размером до 750 мкм, которые выстраиваются внутри слизистых чехлов в прямые нити; особенно крупные размеры характерны для "*Candidatus* Thiomargarita magnifica", длина отдельной клетки которой в среднем превышает 9 мм и может достигать 2 см (Volland *et al*., 2022). Некоторые нитчатые представители обладают скользящей подвижностью и образуют бактериальные маты в сульфидных биотопах (Mußmann *et al*., 2003; Salman *et al*., 2011; Hinck *et al*., 2011; Dubinina *et al*., 2017; Grünke *et al*., 2012; Gureeva *et al*., 2019). Представители *Beggiatoaceae* способны осуществлять литоавтотрофный, миксотрофный и гетеротрофный типы метаболизма (Salman *et al*., 2011; Dubinina *et al*., 2017; Gureeva *et al*., 2019; Rudenko *et al*., 2020). Наиболее характерной особенностью семейства является способность к окислению восстановленных соединений серы, которое сопровождается накоплением в инвагинатах цитоплазматической мембраны внутриклеточной элементной серы в виде серных глобул (Strohl, Larkin, 1978; Nelson, Castenholz, 1981; Larkin, Henk, 1996; Berg *et al*., 2014; Dubinina *et al*., 2017; Gureeva *et al*., 2019).

Несмотря на более чем полуторавековую историю изучения *Beggiatoaceae*, сведения о физиологии и метаболизме большинства представителей семейства остаются ограниченными вследствие отсутствия чистых культур. На сегодняшний день чистые культуры получены только для трех видов — *Beggiatoa alba, Beggiatoa leptomitoformis* и *Thioflexithrix psekupsensis* (Dubinina *et al*., 2017; Gureeva *et al*., 2019; Schmidt *et al*., 1987). Тем не менее отсутствие чистых культур в меньшей степени влияет на развитие таксономии благодаря внедрению методов метагеномики и филогеномного анализа, существенно расширивших представления о разнообразии *Beggiatoaceae*. Согласно GTDB (англ. Genome Taxonomy Database) (релиз R09-RS220 от 24 апреля 2024 года), семейство *Beggiatoaceae* включало уже 25 родов и 64 геномные последовательности (Parks *et al*., 2018; Parks *et al*., 2022). Однако только шесть родов идентифицированы как ранее описанные *Beggiatoa*, *Thioploca*, *Thiomargarita*, *Thioflexithrix*, "*Candidatus* Marithrix" и "*Candidatus* Venteria". Несмотря на существенное увеличение объема геномных данных и предполагаемого разнообразия семейства, значительная часть представителей *Beggiatoaceae* по-прежнему остается таксономически неидентифицированной.

Таким образом, современное состояние систематики *Beggiatoaceae* требует дополнительного уточнения и сопоставления геномных данных с ранее описанными таксонами. Получение чистых культур и секвенирование их геномов могло бы существенно продвинуть систематику семейства. Однако серьезным препятствием остаются трудности культивирования или даже невозможность культивирования подавляющего большинства представителей *Beggiatoaceae*. Поэтому в настоящее время решение проблем таксономии семейства возможно главным образом на основе комплексного подхода, сочетающего метагеномный анализ, полевые наблюдения и микроскопическое изучение морфологии бактерий.

Среди представителей семейства *Beggiatoaceae* род *Beggiatoa* является одним из наиболее изученных и исторически значимых. Именно на примере *Beggiatoa*

Сергей Николаевич Виноградский в конце XIX века сформулировал концепцию хемосинтеза (хемолитотрофии), ставшую ключевой для понимания метаболизма микроорганизмов и их роли в биосфере.

Несмотря на длительную историю изучения *Beggiatoa*, ряд аспектов их диссимиляционного серного метаболизма до настоящего времени остается недостаточно исследованным. В частности, долгое время оставались неясными механизмы накопления и последующего окисления внутриклеточной элементной серы.

Особый интерес в связи с этим представляют штаммы *B. leptomitoformis* D-401 и D-402^{T}. При росте в присутствии восстановленных соединений серы штаммы D-401 и D-402 различаются по способности к накоплению внутриклеточной элементной серы. У штамма D-402 формируются серные глобулы, тогда как у штамма D-401 их образование не наблюдается (Fomenkov *et al*., 2018). Причины наблюдаемых физиологических различий между штаммами до настоящего времени оставались неясными.

Другой нерешенной проблемой физиологии представителей *Beggiatoa* оставался механизм окисления внутриклеточной элементной серы. Хотя способность бактерий этого рода к накоплению внутриклеточной серы хорошо известна, механизмы ее дальнейшего метаболизма и окисления длительное время оставались недостаточно изученными (Schmidt *et al*., 1987; Dubinina *et al*., 2017).

Исследование этих процессов представляет особый интерес, поскольку аналогичные механизмы могут быть характерны не только для исследованных штаммов *B. leptomitoformis*, но и для других представителей рода *Beggiatoa*, включая *B. alba*, а также для новых видов семейства *Beggiatoaceae*, которые могут быть выделены в чистую культуру в дальнейшем.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось исследование физиолого-биохимических и геномных особенностей диссимиляционного серного метаболизма у *Beggiatoa leptomitoformis*, а также сравнительный филогеномный анализ представителей семейства *Beggiatoaceae*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить геномные различия между штаммами *B. leptomitoformis* D-401 и D-402, различающимися по способности к накоплению внутриклеточной элементной серы в присутствии восстановленных соединений серы.
2. Оценить связь выявленных геномных различий с утратой способности штамма *B. leptomitoformis* D-401 к накоплению внутриклеточной элементной серы.
3. Установить возможный механизм превращения внутриклеточной элементной серы у *B. leptomitoformis* D-402 и его связь с энергетическим метаболизмом клетки.
4. Провести филогеномный анализ для установления таксономического положения новых геномов WS_Bin1 и WS_Bin3 гигантских нитчатых серобактерий, собранных из метагеномов прибрежно-морских серных матов Белого моря.
5. Оценить генетический потенциал основных метаболических путей на основе сравнительного анализа MAG WS_Bin1 и WS_Bin3 и доступных высококачественных геномных сборок родственных представителей семейства *Beggiatoaceae*.

Научная новизна. Впервые проведен детальный сравнительный геномный анализ штаммов *B. leptomitoformis* D-401 и D-402, обладающих резко различающимися

фенотипическими и физиолого-биохимическими свойствами, показавший чрезвычайно высокий уровень геномного сходства (>99,5 %). Было показано, что при идентичном составе генов диссимиляционного метаболизма соединений серы у обоих штаммов отсутствие накопления внутриклеточной элементной серы у штамма D-401 ассоциировано с транспозонной вставкой в ген предполагаемого белка оболочки серных глобул.

Впервые предложен и экспериментально обоснован механизм окисления внутриклеточной элементной серы у *B. leptomitoformis* D-402, в котором ключевую роль играет персульфиддиоксигеназа (PDO). Предсказана взаимосвязь PDO и Sox-системы в процессах окисления эндогенной серы и показана возможная связь данного процесса с энергетическим метаболизмом клетки. Кроме того, впервые для представителя бесцветных нитчатых серобактерий была получена и депонирована в PDB (англ. Protein Data Bank) кристаллическая структура рекомбинантной персульфиддиоксигеназы из штамма D-402 (8ZBD).

На основании анализа двух новых MAG (англ. metagenome-assembled genomes) и доступных геномов уточнена таксономическая структура семейства *Beggiatoaceae*. Установлено соответствие кандидатного рода «UBA10656» в классификации GTDB ранее описанному роду "*Candidatus* Parabeggiatoa". Описаны новый род "*Candidatus* Albibeggiatoa" gen. nov., соответствующий кандидатному роду «BB20» в классификации GTDB, и новый вид "*Candidatus* Albibeggiatoa psychrophila" sp. nov. На основе сравнительного анализа геномов охарактеризован метаболический потенциал представителей двух родов. По сравнению с ранее опубликованными данными для представителей семейства *Beggiatoaceae* полученные результаты позволяют более полно охарактеризовать особенности метаболизма исследованных организмов и расширить представления об их физиологическом потенциале.

Теоретическая и практическая значимость. Представители семейства *Beggiatoaceae* рассматриваются как важные участники биогеохимических циклов серы и азота в донных осадках водных экосистем (Wasmund *et al.*, 2017; Flood *et al.*, 2021). Это связано с их способностью окислять сероводород и, у ряда представителей, использовать нитрат в качестве альтернативного акцептора электронов при анаэробном окислении сульфида (Kamp *et al.*, 2006; Flood *et al.*, 2021; Chuang *et al.*, 2022). В донных осадках бактерии *Beggiatoaceae* формируют микробные маты в зонах контакта кислородсодержащих и сульфидных слоев, участвуя в процессах окисления сульфида и формировании химического градиента на границе аэробных и анаэробных условий (Møller *et al.*, 1985; Flood *et al.*, 2021).

Считается, что представители *Beggiatoaceae* играют важную роль в регуляции и детоксикации потоков сульфидов из донных осадков в водную толщу за счет процессов окисления сероводорода (Flood *et al.*, 2021). Массовое развитие представителей семейства обычно связано с гипоксическими и сульфидными условиями, а также с высокой органической нагрузкой, поэтому их присутствие рассматривается как признак активных процессов анаэробного разложения органического вещества и нарушений кислородного режима в донных осадках (Jørgensen *et al.*, 2019).

Таким образом, представители семейства *Beggiatoaceae* могут рассматриваться как индикаторы гипоксических и сульфидных условий и высокой органической нагрузки в донных осадках, а их изучение имеет значение для экологической оценки водных

экосистем и интерпретации процессов серного и азотного циклов. При этом прямое использование представителей семейства в прикладных технологиях остается ограниченным вследствие трудностей культивирования многих форм и недостаточной изученности их физиологии и метаболизма.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Накопление внутриклеточной элементной серы в присутствии восстановленных соединений серы у *B. leptomitoformis* зависит от функционирования белка оболочки серных глобул. Транспозонная вставка в белок-кодирующую область соответствующего гена приводит к утрате способности к накоплению внутриклеточной элементной серы у штамма *B. leptomitoformis* D-401.
2. Персульфиддиоксигеназа играет ключевую роль в окислении внутриклеточной элементной серы у *B. leptomitoformis* D-402. Предложена модель функциональной взаимосвязи персульфиддиоксигеназы и Sox-системы окисления тиосульфата, согласно которой внутриклеточная элементная сера может выступать в качестве опосредованного эндогенного донора электронов для энергетического метаболизма клетки.
3. Рекомбинантная персульфиддиоксигеназа из *B. leptomitoformis* D-402 относится к персульфиддиоксигеназам I типа семейства металло-β-лактамаз и катализирует окисление глутатионперсульфида. Впервые получена и депонирована в PDB ее кристаллическая структура, выявившая структурную специфику белка.
4. Уточнена таксономическая структура семейства *Beggiatoaceae*. Кандидатный род «UBA10656» в классификации GTDB семейства *Beggiatoaceae* соответствует роду "*Candidatus* Parabeggiatoa", тогда как кандидатный род «BB20» представляет новый род "*Candidatus* Albibeggiatoa" gen. nov. Сравнительный анализ геномов представителей родов "*Ca*. Parabeggiatoa" и "*Ca*. Albibeggiatoa" выявил сходный набор генов, потенциально обеспечивающих литоавтотрофный метаболизм за счет окисления восстановленных соединений серы, а также различия в генетическом потенциале метаболизма соединений азота и углерода.

Степень достоверности полученных результатов. Достоверность полученных результатов обеспечена корректностью постановки экспериментов, использованием современных методов исследования и оборудования, воспроизводимостью экспериментальных данных, а также статистической обработкой полученных результатов.

Публикации и апробация работы. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 3 статьи в международных рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science, а также 5 тезисов конференций.

Материалы диссертации были представлены на международных и всероссийских научных конференциях, в том числе на FEMS 2020 ONLINE Conference on Microbiology (2020 г., Белград, Сербия), 3-м Российском микробиологическом конгрессе (2021 г., Псков), 4-м Российском микробиологическом конгрессе (2023 г., Томск), XIV Международной мультиконференции «Биоинформатика регуляции и структуры

геномов / системная биология» BGRS/SB-2024 (2024 г., Новосибирск), а также на Международной научной конференции «Физико-химическая биология» (2025 г., Москва).

Объем и структура диссертационной работы. Диссертация изложена на 147 страницах, содержит 33 рисунка и 12 таблиц. Работа включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть с описанием объекта и методов исследования, раздел результатов и их обсуждения, заключение, выводы, список сокращений и список цитируемой литературы, насчитывающий 199 источников, и приложение с таблицей аннотации генов.

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы базировалась на сочетании экспериментальных исследований и анализа геномных данных. Для выполнения работы использованы микробиологические, биохимические, молекулярно-генетические и структурно-биологические методы, а также биоинформатический анализ. Выбор методов определялся характером решаемых задач и особенностями изучаемых объектов.

Личный вклад автора. Представленные в работе результаты получены автором лично или при его непосредственном участии на всех этапах исследования, включая постановку научной задачи, планирование экспериментов, анализ и систематизацию данных, интерпретацию результатов, формулирование основных выводов работы и подготовку их к публикации. Автором лично выполнены работы по аннотированию геномов, анализу экспрессии генов, обработке и интерпретации данных протеомного анализа. При непосредственном участии автора были выполнены работы по получению рекомбинантного белка персульфиддиоксигеназы и исследованию его физико-химических и биохимических свойств.

Место проведения работы и благодарности. Работа выполнена на кафедре биохимии и физиологии клетки медико-биологического факультета ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» под руководством д.б.н., профессора М.Ю. Грабович.

Автор выражает признательность к.б.н. С.В. Тарлачкову (группа молекулярной биотехнологии, ГНЦ ИБХ РАН) за помощь в проведении сравнительного геномного анализа штаммов *B. leptomitoformis* D-401 и D-402. Автор благодарит сотрудников ЦКП «Протеом человека» (ИБМХ, Москва) под руководством к.б.н. О.В. Тихоновой за выполнение MALDI-TOF/TOF-MS-анализа и ВЭЖХ-МС/МС, а также сотрудников ЦКП «Передовой масс-спектрометрии» Сколковского института науки и технологий за выполнение ВЭЖХ-МС/МС. Особую признательность автор выражает к.б.н. Л.И. Трубициной и к.б.н. И.В. Трубицину (лаборатория микробной энзимологии, ИБФМ РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН), а также к.б.н. В.В. Терентьеву (лаборатория фотосинтетического окисления воды, ИФБП РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН) за помощь в получении рекомбинантной персульфиддиоксигеназы и исследовании ее физико-химических и биохимических свойств. Автор выражает благодарность д.б.н. С.В. Тищенко (лаборатория структурных исследований аппарата трансляции, Институт белка РАН) и к.б.н. А.Г. Габдулхакову (группа структурных исследований макромолекулярных комплексов, Институт белка РАН) за проведение работ по

получению и анализу кристаллической структуры белка. Автор также благодарит к.б.н. В.В. Кевбрина (лаборатория реликтовых микробных сообществ, ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН) за проведение анализа продуктов окисления соединений серы. Автор признателен д.б.н. Н.В. Равину и А.В. Белецкому (отдел молекулярной биологии микроорганизмов, Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН) за выполнение блока работ по метагеномному секвенированию и сборке MAG представителей семейства *Beggiatoaceae*, к.б.н. М.С. Мунтян (лаборатория структуры и функции митохондрий, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ) за помощь в выделении ДНК для метагеномного анализа, а также водолазам Д. Озерову, А. Кудрявкиной и П. Карманову (Беломорская биологическая станция им. Н.А. Перцова) за помощь в отборе проб и проведении подводной фотосъемки.

Глубокую признательность автор выражает научному руководителю д.б.н., профессору М.Ю. Грабович за постоянную поддержку, ценные советы и неоценимую помощь на всех этапах выполнения диссертационной работы.

Работа выполнена в рамках проектов, поддержанных Российским научным фондом (№ 20-14-00137-П) и Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ) (№ 18-04-00556).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ
ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили штаммы *Beggiatoa leptomitoformis* D-401 и D-402, выделенные из пресноводных источников, загрязненных бытовыми и сельскохозяйственными сточными водами, в г. Борке Ярославской области и г. Дмитрове Московской области соответственно (Dubinina *et al.*, 2017). Штаммы культивировали при 27 °C на минеральной среде с добавлением витаминов и микроэлементов (Pfennig, Lippert, 1966) в хемоорганогетеротрофных, хемолитогетеротрофных и хемолитоавтотрофных условиях. В качестве доноров электронов использовали тиосульфат натрия, сульфид натрия или внутриклеточную элементную серу, в качестве органического субстрата — лактат. Для изучения превращения внутриклеточной серы штамм D-402 после накопления серных глобул переносили на обедненную минеральную среду. Отсутствие сульфида контролировали йодометрическим титрованием, наличие внутриклеточной серы оценивали микроскопически.

Поиск, аннотацию и сравнительный анализ генов проводили с использованием RAST 2 (Brettin *et al.*, 2015), баз данных NCBI и алгоритма BLASTP. Выравнивание последовательностей выполняли в программе ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), филогенетический анализ — в программах MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013), MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021) и PhyML v. 3.3 (Guindon *et al.*, 2010). Субклеточную локализацию белков, наличие сигнальных пептидов и консервативных доменов определяли с использованием PSORTB v3.0 (Yu *et al.*, 2010), SignalP v.5.0 (Almagro Armenteros *et al.*, 2019), InterPro (Paysan-Lafosse *et al.*, 2023) и базы данных NCBI. Для оценки геномного родства рассчитывали значения средней нуклеотидной идентичности (ANI; англ. average nucleotide identity) на основе алгоритма OrthoANI (Lee *et al.*, 2016) и средней аминокислотной идентичности (AAI; англ. average amino acid identity) (Rodriguez-R, Konstantinidis, 2016), а филогеномный анализ проводили на основе 120 однокопийных маркерных генов с использованием GTDB-Tk v.1.5.0 (Chaumeil *et al.*, 2019).

Наличие белков-кандидатов у штаммов D-401 и D-402 анализировали методом двумерного гель-электрофореза (O'Farrell, 1975) с последующей MALDI-TOF/TOF-MS-идентификацией (Petushkova *et al*., 2015; Fisunov *et al*., 2011), а также методом ВЭЖХ-МС/МС (Anselm *et al*., 2017); подготовку образцов для ВЭЖХ-МС/МС проводили методом FASP (Anselm *et al*., 2017), идентификацию белков — с использованием SearchGUI v. 3.3.17 (Barsnes, Vaudel, 2018) и PeptideShaker v. 1.16.44 (Vaudel *et al*., 2015). Для протеомного анализа штамма D-402 при использовании внутриклеточной элементной серы образцы готовили методом S-Trap (Zougman *et al*., 2014), ВЭЖХ-МС/МС-данные обрабатывали с использованием MaxQuant v.1.6.17.0 (Cox, Mann, 2011) и Perseus v.1.6.15.0.

Для изучения функциональной роли персульфиддиоксигеназы ген *pdo* амплифицировали из геномной ДНК *B. leptomitoformis* D-402, клонировали в экспрессионный вектор pET-22b(+) и экспрессировали в клетках *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3). Рекомбинантный белок очищали методом металл-аффинной хроматографии, а его молекулярную массу определяли методом SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Активность PDO оценивали по скорости потребления кислорода при окислении глутатионперсульфида с использованием электрода Кларка по модифицированному методу Suzuki (Suzuki, 1965). Глутатионперсульфид получали при взаимодействии восстановленного глутатиона с насыщенным раствором элементной серы (Visser *et al*., 1997). Для биохимической характеристики фермента определяли оптимальные значения pH и температуры, стабильность при различных условиях, а также влияние ионов металлов и ЭДТА на активность PDO.

Кристаллизацию рекомбинантной PDO проводили методом диффузии паров в висячей капле. Дифракционные данные получали на станции BL18U1 синхротронного источника SSRF (Китай). Обработку дифракционных данных выполняли с использованием программы XDS (Kabsch, 2010), построение и уточнение пространственной модели белка — с использованием программ Phaser (McCoy *et al*., 2007), REFMAC5 (Murshudov *et al*., 2011), Coot (Emsley *et al*., 2010) и Phenix (Liebschner *et al*., 2019), визуализацию — в программе PyMOL (Schrödinger, DeLano, 2020). Координаты атомов и структурные факторы были депонированы в базу данных PDB (англ. Protein Data Bank).

Экспрессию исследуемых генов определяли методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. У *B. leptomitoformis* D-402 при хемолитоавтотрофном росте в присутствии сульфида натрия или внутриклеточной элементной серы анализировали экспрессию *pdo* и генов Sox-системы (*soxAX*, *soxB*, *soxY*, *soxZ*); экспрессию последних дополнительно сравнивали у штаммов D-401 и D-402 при хемолитогетеротрофном росте в присутствии тиосульфата и лактата. У D-402 при хемолитогетеротрофном и хемоорганогетеротрофном росте оценивали экспрессию генов, кодирующих белки ALG67575.1, ALG68134.1 и ALG67202.2. В качестве референсных генов использовали *gyrB* и *rrs*.

Для изучения разнообразия представителей семейства *Beggiatoaceae* использовали образцы серных матов, отобранные в заливе Белого моря. Метагеномное секвенирование выполняли с использованием технологии Illumina, сборку контигов — программами metaSPAdes v.3.15.4 (Nurk *et al*., 2017) и MEGAHIT v.1.2.9 (Li *et al*., 2015), биннинг — с использованием MaxBin v.2.2.7 (Wu *et al*., 2016), CONCOCT v.1.0.0 (Alneberg *et al*., 2014), MetaBAT v.2.15 (Kang *et al*., 2019). Результаты биннинга объединяли и оптимизировали с использованием программы DAS Tool v.1.1.4 (Sieber *et al*., 2018). Таксономическую

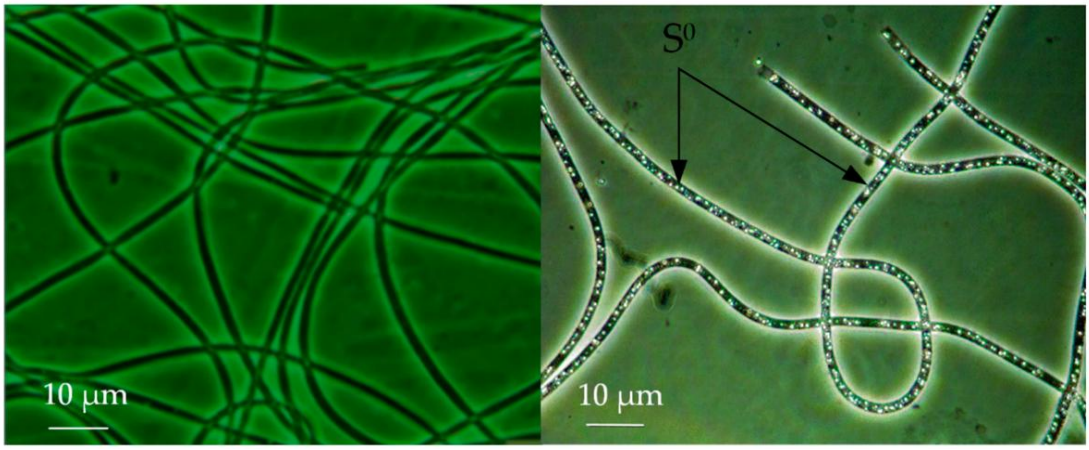
классификацию MAG проводили с помощью GTDB-Tk v.1.5.0 (англ. Genome Taxonomy Database Toolkit) (Chaumeil *et al*., 2019) и базы данных GTDB (Parks *et al*., 2022). Оценку полноты и контаминации собранных геномов проводили с использованием программы CheckM2 v.1.0.1 (Chklovski *et al*., 2023).

Тиосульфат и сульфат определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с кондуктометрическим детектированием. Содержание внутриклеточной элементной серы и морфологические особенности клеток анализировали методами световой и фазово-контрастной микроскопии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

I. Исследование природы фенотипических и физиолого-биохимических различий штаммов *Beggiatoa leptomitoformis* D-401 и D-402

Представители нитчатых бесцветных сероокисляющих бактерий часто доминируют в сульфидных биотопах, препятствуя диффузии токсичного сульфида в толщу воды. Особый интерес представляет вид *Beggiatoa leptomitoformis*, включающий штаммы D-401 и D-402. Примечательно, что штамм *B. leptomitoformis* D-401, в отличие от типового штамма D-402^T, не накапливает внутриклеточную элементную серу в присутствии восстановленных соединений серы (Рисунок 1) (Dubinina *et al*., 2017; Fomenkov *et al*., 2018).



(а) **(б)**

Рисунок 1 — Фазово-контрастные микрофотографии клеток *Beggiatoa leptomitoformis* D-401 (а) и D-402 (б), выращенных на среде с тиосульфатом и лактатом

Стрелками указаны включения элементной серы (S^0) в клетках штамма D-402 (цит. по Rudenko *et al*., 2020).

В геномах обоих штаммов выявлен идентичный набор генов, кодирующих компоненты известных систем диссимиляционного окисления соединений серы (Таблица 1); различий в кодирующих и промоторных областях этих генов также обнаружено не было. Это позволило предположить, что наблюдаемые физиологические различия могут быть обусловлены изменениями в других генах, потенциально связанных с процессом накопления внутриклеточной элементной серы.

Полногеномное сравнение не выявило крупных перестроек генома. Однако геномы штаммов различались по 16 локусам, содержащим вставки (Рисунок 2, Таблица 2, 3). Для 14 из них была установлена транспозонная природа.

Таблица 1 — Гены, кодирующие ферменты диссимиляционного метаболизма соединений серы у *B. leptomitoformis* D-401 и D-402

***B. leptomitoformis* D-401**		***B. leptomitoformis* D-402**		**Ген**
Locus tag	**Номер доступа белка**	**Locus tag**	**Номер доступа белка**	
BLE401_07405	AUI68548.1	AL038_16835	ALG69045.1	*sqrA*
BLE401_09970	AUI68992.1	AL038_14290	ALG68656.1	*sqrF*
BLE401_03540	AUI67863.1	AL038_02505	ALG66791.1	*fccA*
BLE401_03535	AUI67862.2	AL038_02510	ALG69293.2	*fccB*
BLE401_14705	AUI69816.1	AL038_09565	ALG67913.1	*soxY*
BLE401_14710	AUI69817.1	AL038_09560	ALG67912.1	*soxZ*
BLE401_13150	AUI69545.1	AL038_11110	ALG68158.1	*soxAX*
BLE401_00760	AUI67367.1	AL038_05225	ALG67220.1	*soxB*
BLE401_03540	AUI67863.1	AL038_02505	ALG66791.1	*soxF*
BLE401_16835	AUI70200.1	AL038_07480	ALG67570.1	*dsrE*
BLE401_16840	AUI70201.1	AL038_07475	ALG67569.1	*dsrF*
BLE401_16845	AUI70202.1	AL038_07470	ALG67568.1	*dsrH*
BLE401_16850	AUI70203.1	AL038_07465	ALG67567.1	*dsrC*
BLE401_14535	AUI70655.1	AL038_09735	ALG69423.1	*soeA*
BLE401_14540	AUI69788.1	AL038_09730	ALG67939.1	*soeB*
BLE401_14545	AUI69789.1	AL038_09725	ALG67938.1	*soeC*

Гены сгруппированы в соответствии с метаболическими путями. Ген *soxAX* кодирует слитый белок SoxAX (цит. по Rudenko *et al*., 2020; Dubinina *et al*., 2017).

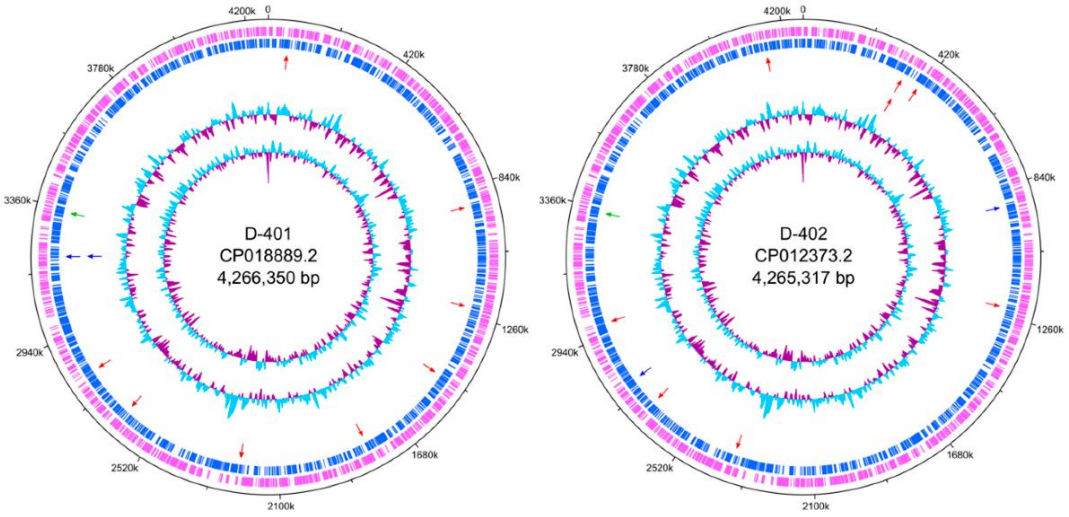


Рисунок 2 — Карта различий между геномами *B. leptomitoformis* D-401 и D-402
От внешнего кольца к внутреннему: кольца 1 и 2 — предсказанные открытые рамки считывания (ORF), расположенные в прямой и обратной ориентации соответственно; на кольце 3 стрелками обозначены положения выявленных различий между геномами: красными стрелками — длинные вставки, синими — однонуклеотидные вставки, зеленой — однонуклеотидная замена; кольцо 4 — профиль GC-состава, отражающий отклонения от среднего значения; кольцо 5 — GC-асимметрия (GC-skew). Координаты указаны в парах нуклеотидов (цит. по Rudenko *et al*., 2020).

Таблица 2 — Координаты и длина вставок, выявленных в геноме *B. leptomitoformis* D-401 относительно генома штамма D-402 (цит. по Rudenko *et al.*, 2020)

Координата начала вставки в геноме D-401, п.н.	Координата конца вставки в геноме D-401, п.н.	Соответствующая координата в геноме D-402, п.н.	Длина вставки, п.н.
61181	61962	61181	782
899367	900148	900303	782
1232218	1233070	1232372	853
1476556	1477337	1476710	782
1803656	1804508	1803028	853
2225476	2226257	2223995	782
2636787	2637639	2635377	853
2808257	2809109	2806848	853
3201146	3201146	3199262	1
3202340	3202340	3200455	1

Таблица 3 — Координаты и длина вставок, выявленных в геноме *B. leptomitoformis* D-402 относительно генома штамма D-401 (цит. по Rudenko *et al.*, 2020)

Координата начала вставки в геноме D-402, п.н.	Координата конца вставки в геноме D-402, п.н.	Соответствующая координата в геноме D-401, п.н.	Длина вставки, п.н.
343050	343902	343832	853
344559	344569	344488	11
403648	404500	403566	853
898872	898872	897937	1
1233230	1234082	1233929	853
2359978	2360830	2362241	853
2676235	2677087	2678498	853
2773108	2773108	2774518	1
2979897	2980274	2982159	378
4144239	4145091	4146125	853

Для оценки возможной связи выявленных различий с исследуемым фенотипом были определены гены и регуляторные области, затронутые вставками. Наибольший интерес представляли три транспозона, локализованные в кодирующих областях генов штамма D-401. Один из затронутых генов кодировал предполагаемый белок оболочки серных глобул ALG67575.1. Последовательность данного белка содержала N-концевой сигнальный пептид и была обогащена регулярно расположенными остатками пролина, что характерно для ранее описанных белков оболочки серных глобул (Dahl, 2017). Гомологичные белки были выявлены у филогенетически близких представителей семейства *Beggiatoaceae*. На основании этих данных ALG67575.1 рассматривался как наиболее вероятный кандидат, связанный с отсутствием накопления внутриклеточной элементной серы у штамма D-401. Два других гена кодировали гипотетические белки.

Один из них был аннотирован как предполагаемый порин (ALG68134.1), второй содержал сенсорный домен неизвестной функции (ALG67202.2).

Для проверки синтеза белков, кодируемых генами, нарушенными транспозонными вставками, был проведен сравнительный протеомный анализ штаммов D-401 и D-402, культивируемых в присутствии лактата и тиосульфата. Методом MALDI-TOF/TOF-MS были исследованы белковые пятна, расположенные в областях протеомных карт, соответствующих расчетным значениям молекулярной массы и изоэлектрической точки исследуемых белков. В образце штамма D-402 были идентифицированы пептиды, соответствующие предполагаемому белку оболочки серных глобул ALG67575.1 и предполагаемому порину ALG68134.1. Для штамма D-401 указанные белки обнаружены не были. Белок ALG67202.2 не был идентифицирован ни в одном из исследованных образцов.

Дополнительно наличие исследуемых белков было проанализировано методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). В образце штамма D-402 были идентифицированы предполагаемый порин ALG68134.1 (идентификатор TrEMBL UPI0007069FE2) и предполагаемый белок оболочки серных глобул ALG67575.1 (идентификатор TrEMBL UPI00070625ED), тогда как в протеоме штамма D-401 данные белки выявлены не были.

Сопоставление результатов MALDI-TOF/TOF-MS и ВЭЖХ-МС/МС показало, что для белка ALG68134.1 пептиды, выявленные методом ВЭЖХ-МС/МС, включали последовательности, обнаруженные методом MALDI-TOF/TOF-MS; покрытие последовательности составило 71,6 %. Для белка ALG67575.1 покрытие последовательности составило 40,4 %; при этом пептид из N-концевой области был идентифицирован только методом MALDI-TOF/TOF-MS, тогда как пептиды С-концевой области были выявлены обоими методами (Рисунок 3).

А.

MSFSKHLQVGCASALVALAPFAMADDAADMKR**QLQQLQQRLDTLESNPGMSLGAKPKFSLQLSG**
QVNRAVMYGDDGTDSDTFFVDGDTDASRVEILGKHSLSDDVTLGTNIEVE**YLSNSSSEVDINQT**
KSVDHNGFSERTLEFYAESATLGRLSLGQGSMASNDTAEYDLNSSSLAGMY**SFGADFGANLSFR**
DADTKAK**IATIGQVHSNFDGLDRDDRIRYDTPSFGGLTLSVAASTAEKWDAGITFQR**TFGPIDL
ALGLGYGNVGDSEAYLYEDDEGNTYQLYK**HVYSASFSILHTPSGLSMTLAGGGLSNDSLTTTIK**
DLPSNVSDTLGDNREDTDPFSWSAKLGYAIDATSIGKTSFGLSYNRTEDYR**TCLGYDSVNNTDV**
FLSCGDKYSSYGFGLVQAIDKASTEIYFGARNHQLESAGLNPDDILTIYSGARVKF

Б.

MLKIAKVLALSTVLGAGFVAAPAHAWWGGPGSGWGNNEWGPFDGSGWGDFNMSMGGGGRGYGRQ
YNNYNYSGYPGYYGGYAPAPAYGAAPYGGYAPAPYAGYGVAPAPYAGYGAAPYGGGYAPAPYAG
YGVAPY**GAVPPASVPAPAAPEAK**

Рисунок 3 — Покрытие последовательности белка ALG68134.1 (А) и ALG67575.1 (Б) идентифицированными пептидами

Пептиды, которые были идентифицированы с помощью ВЭЖХ-МС/МС, выделены жирным шрифтом красного цвета; пептидные последовательности, которые были идентифицированы с помощью MALDI-TOF/TOF-MS, подчеркнуты (цит. по Rudenko *et al.*, 2020).

Для оценки возможной связи выявленных генов с метаболизмом восстановленных соединений серы был проведен анализ их экспрессии у штамма D-402 при культивировании в присутствии и отсутствии тиосульфата. Показано, что добавление

тиосульфата не влияло на уровень экспрессии генов ALG68134.1 и ALG67202.2. В то же время уровень экспрессии гена ALG67575.1 возрастал примерно в 10 раз (Рисунок 4).

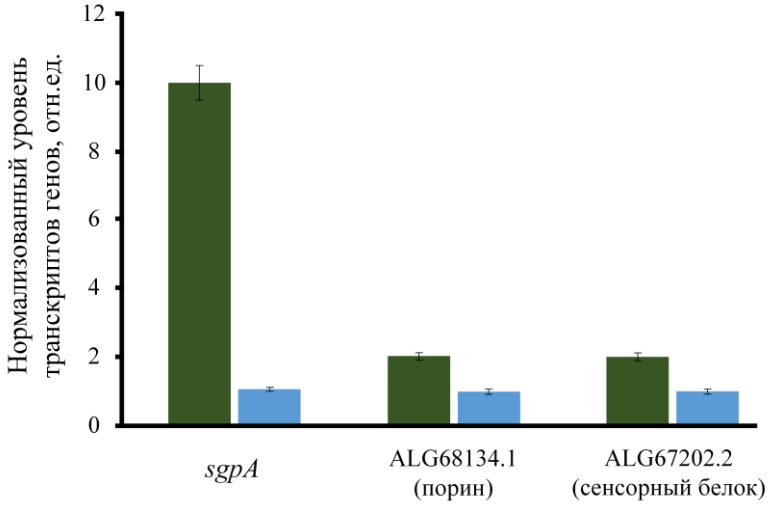


Рисунок 4 — Экспрессия генов, кодирующих белки ALG67575.1 (предполагаемый SgpA), ALG68134.1 и ALG67202.2 штамма *B. leptomitoformis* D-402 при хемолитогетеротрофном и хемоорганогетеротрофном росте

Зеленым цветом обозначена экспрессия при хемолитогетеротрофном росте, голубым цветом обозначена экспрессия при хемоорганогетеротрофном росте (цит. по Rudenko *et al.*, 2020).

Дополнительно была исследована экспрессия генов *soxAX*, *soxB*, *soxY* и *soxZ* у штаммов D-401 и D-402 при хемолитогетеротрофном росте в присутствии лактата и тиосульфата. Экспрессия всех исследованных генов была выявлена у обоих штаммов, однако у D-401 она была на порядок ниже, чем у D-402 (Рисунок 5). У D-402 экспрессия гена *soxB* была в 2,4 раза выше, чем экспрессия остальных исследованных генов Sox-системы.

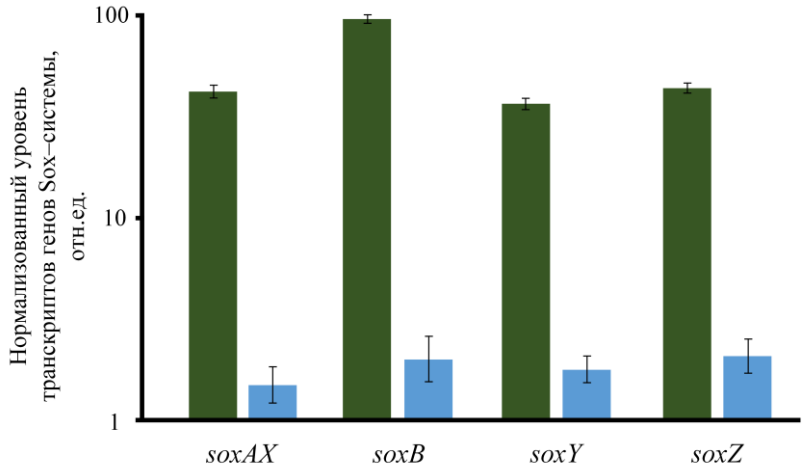


Рисунок 5 — Экспрессия генов Sox-системы у *B. leptomitoformis* D-401 и D-402 при хемолитогетеротрофном росте в присутствии тиосульфата и лактата

Зеленым цветом обозначена экспрессия генов у штамма D-402, голубым цветом — у штамма D-401. Ось ординат представлена в логарифмическом масштабе (основание 10).

В совокупности с результатами сравнительного геномного и протеомного анализов наиболее обоснованным кандидатом, связанным с различиями между

штаммами, являлся белок ALG67575.1. Кодирующий его ген у штамма D-401 был нарушен транспозонной вставкой, а соответствующий полноразмерный белок в протеоме этого штамма обнаружен не был. Полученные результаты согласуются с участием ALG67575.1 в образовании или стабилизации внутриклеточных включений элементной серы у штамма D-402.

II. Механизм окисления внутриклеточной элементной серы у *Beggiatoa leptomitoformis*

Для выяснения механизма превращения внутриклеточной элементной серы у *B. leptomitoformis* D-402 был проведен поиск генов и белков, потенциально участвующих в данном процессе.

Анализ генома показал наличие генов, кодирующих ферменты окисления сульфида (SqrA, SqrF и FccAB), белки Sox-системы окисления тиосульфата и комплекса SoeABC окисления сульфита, а также гены, кодирующие белки Rhd, DsrE-подобный белок и переносчик серы TusA. В то же время в геноме отсутствовали гены rDsrAB, sHdr и SOR, которые у других сероокисляющих прокариот участвуют в превращении элементной серы. Не обнаружены также гены *psrABC* полисульфидредуктазы, обеспечивающей диссимиляционное восстановление полисульфидов до сульфида.

При дополнительном анализе генома были выявлены последовательности белков ALG68607.1 и WP_201800136.1, имеющие около 30 % идентичности с персульфиддиоксигеназами, относящимися к семейству белков металло-β-лактамаз. Филогенетический анализ показал, что белок ALG68607.1 кластеризуется с персульфиддиоксигеназами I типа, тогда как WP_201800136.1 относится к группе глиоксалаз II (Рисунок 6). У гетеротрофных бактерий PDO участвует в детоксикации сероводорода, катализируя окисление глутатионперсульфида (GSSH) (Sattler *et al*., 2015; Xia *et al*., 2017; Xin *et al*., 2020). Однако этот процесс не сопровождается получением энергии. Поскольку у *B. leptomitoformis* не были выявлены известные системы превращения внутриклеточной элементной серы, данный белок был рассмотрен в качестве кандидата на участие в этом процессе.

Для оценки возможного участия PDO в превращении внутриклеточной серы был проведен сравнительный протеомный анализ культуры *B. leptomitoformis* D-402 методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве опытного варианта использовали бактерии, инкубированные на минеральной среде, где внутриклеточная элементная сера выступала в качестве потенциального донора электронов для энергетического метаболизма, а $NaHCO_3$ — источником углерода для конструктивного метаболизма. Образцы для анализа отбирали на седьмые сутки инкубации. В качестве контрольных вариантов использовали культуру, выращенную хемолитогетеротрофно в присутствии тиосульфата и лактата, а также хемоорганогетеротрофно на лактате.

Анализ встречаемости белков и интенсивности сигналов показал, что персульфиддиоксигеназа PDO (идентификатор TrEMBL UPI000706C17D) обнаруживается только в образце культуры, выращенной на обедненной минеральной среде без внешних источников восстановленных соединений серы. Кроме того, для белка SoxB (идентификатор TrEMBL UPI0007061722), а также белков DsrE (идентификатор TrEMBL UPI00070692D2) и TusA (идентификатор TrEMBL UPI0007063E4B) в том же образце было выявлено статистически значимое изменение уровня их содержания.

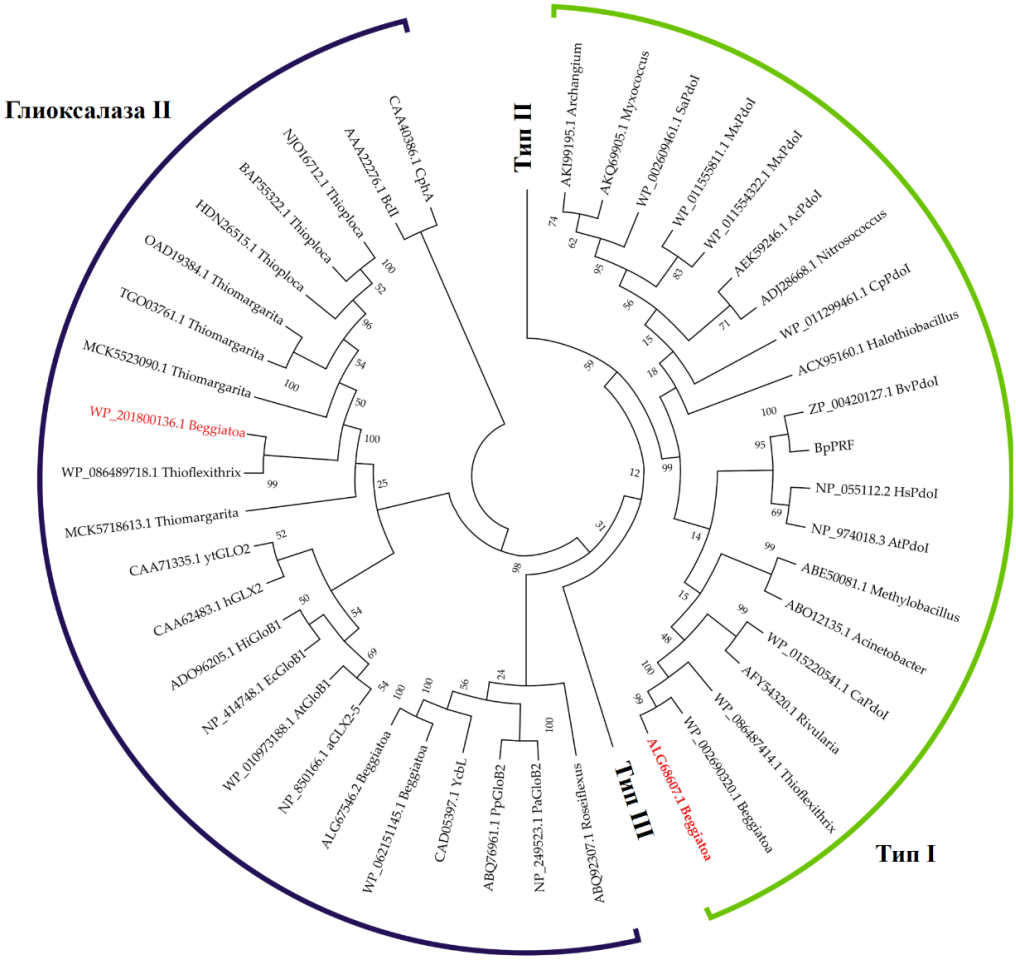


Рисунок 6 — Филогенетическое дерево, построенное на основании предсказанных аминокислотных последовательностей персульфиддиоксигеназ

Кластеризацию проводили методом присоединения соседей. В качестве внешней группы использовали аминокислотные последовательности родственных белков надсемейства металло-β-лактамаз — глиоксалаз II. Филогенетический анализ выполнен с использованием репрезентативной выборки последовательностей персульфиддиоксигеназ из работы Xia *et al.* (2017). В анализ были включены 110 аминокислотных последовательностей, в том числе последовательности представителей семейства *Beggiatoaceae*, выявленные с помощью BLASTP. Две предполагаемые персульфиддиоксигеназы *B. leptomitoformis* выделены красным цветом. Кластер персульфиддиоксигеназ типа I обозначен зеленой линией, кластер глиоксалаз II — темно-фиолетовой; персульфиддиоксигеназы типов II и III объединены в две отдельные свернутые ветви. На дереве указаны идентификаторы белковых последовательностей (цит. по Rudenko *et al.*, 2024).

Для подтверждения функциональной принадлежности белка ALG68607.1 к персульфиддиоксигеназам ген *pdo* штамма *B. leptomitoformis* D-402 был клонирован в плазмиду pET-22b(+). В аминокислотной последовательности белка были выявлены три консервативных остатка, участвующих в связывании иона железа (His57, His113 и Asp134), а также три консервативных остатка, формирующих участок связывания субстрата (Asp61, Tyr177 и Arg194), что согласуется с данными для других персульфиддиоксигеназ I типа (Sattler *et al.*, 2015; McCoy *et al.*, 2006; Pettinati *et al.*, 2015; Motl *et al.*, 2017).

Известно, что сульфид окисляется с образованием сульфановой серы, которая затем переносится на глутатион с образованием глутатионперсульфида (GSSH), являющегося субстратом для реакции, катализируемой персульфиддиоксигеназой

(Rohwerder, Sand, 2003; Jackson, 2012). Поэтому для проверки способности полученной рекомбинантной PDO окислять данный субстрат ферментативную активность определяли по скорости поглощения кислорода в присутствии GSSH. Установлено, что в присутствии GSSH белок катализирует поглощение кислорода со скоростью около 174 мкмоль $O_2 \cdot мг^{-1} \cdot ч^{-1}$, что соответствует активности около 2900 $U \cdot мг^{-1}$. По своим физико-химическим и биохимическим свойствам фермент соответствовал ранее описанным персульфиддиоксигеназам, проявляя максимальную активность при pH 7,5 и температуре 40 °C и чувствительность к ионам Cu^{2+}, Zn^{2+} и Ni^{2+}.

Впервые определена кристаллическая структура персульфиддиоксигеназы из *B. leptomitoformis* D-402 и депонирована в базе PDB (8ZBD). Кристаллографический анализ рекомбинантной PDO показал, что пространственная организация активного центра в целом соответствует ранее описанным персульфиддиоксигеназам I типа, включая белок человека hETHE1 (pdb id 4CHL; RMSD = 1,1 Å), белок *Arabidopsis thaliana* (pdb id 2GCU; RMSD = 1,07 Å), *Mx*PDOI *Myxococcus xanthus* (pdb id 4YSB; RMSD = 0,97 Å) и *Bp*PRF *Paraburkholderia phytofirmans* (pdb id 5VE5; RMSD = 1,05 Å) (Sattler *et al.*, 2015; McCoy *et al.*, 2006; Pettinati *et al.*, 2015; Motl *et al.*, 2017). Активный центр содержит консервативные остатки His57, His113 и Asp134, участвующие в координации иона железа, а также остатки Asp61, Tyr177 и Arg194, формирующие участок связывания субстрата (Рисунок 7).

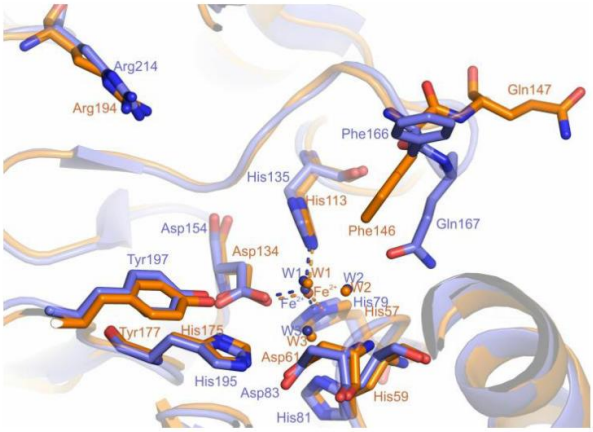


Рисунок 7 — Суперпозиция структур активных центров PDO *B. leptomitoformis* (оранжевый цвет) и hETHE1 (структура PDO человека) (синий цвет)
Ионы железа и молекулы воды (W1, W2, W3), координирующие ион железа (показано пунктирными линиями), обозначены сферами (цит. по Rudenko *et al.*, 2024).

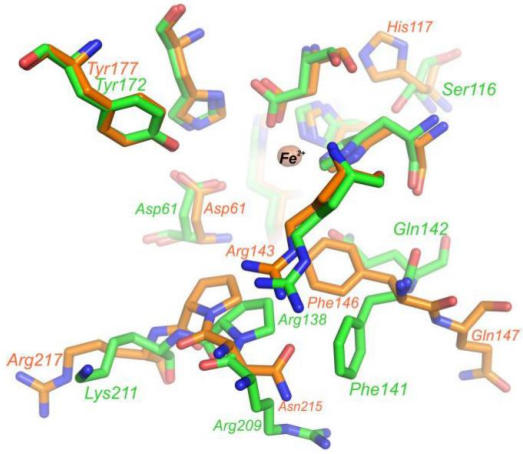


Рисунок 8 — Суперпозиция структур активных центров PDO *B. leptomitoformis* (оранжевый) и *Mx*PDOI (*Myxococcus xanthus*) (зеленый) (цит. по Rudenko *et al.*, 2024)

Вместе с тем были выявлены особенности структуры белка, отличающие PDO *B. leptomitoformis* от других представителей данного семейства. Так, во второй координационной сфере активного центра остаток His117 замещает характерные для других PDO остатки цистеина или серина. Кроме того, обнаружены различия в геометрии участка связывания субстрата и организации межмономерного интерфейса, связанные с пространственным расположением остатков Phe146 и Gln147 (Рисунок 8). Эти особенности указывали на структурную специфику PDO *B. leptomitoformis*.

Для проверки участия персульфиддиоксигеназы в процессах превращения элементной серы у *B. leptomitoformis* D-402 был проведен анализ экспрессии гена *pdo* методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Длительное культивирование штамма D-402 в условиях использования внутриклеточной серы показало, что в течение первых семи суток происходит постепенное исчезновение серных глобул из клеток, после чего они вновь начинают накапливаться. Уровень экспрессии *pdo* определяли в различные сроки культивирования, охватывающие период уменьшения количества серных глобул в клетках. Установлено, что максимальная экспрессия гена *pdo* наблюдалась на седьмые сутки инкубации в присутствии внутриклеточной элементной серы как единственного источника энергии. Уровень экспрессии в этот период в среднем в 35 раз превышал значения, зарегистрированные в другие сроки наблюдения, и в 25 раз — значения контрольных вариантов при хемоорганогетеротрофном росте на лактате, а также при хемолитоавтотрофном росте с сульфидом в качестве донора электронов (Рисунок 9А).

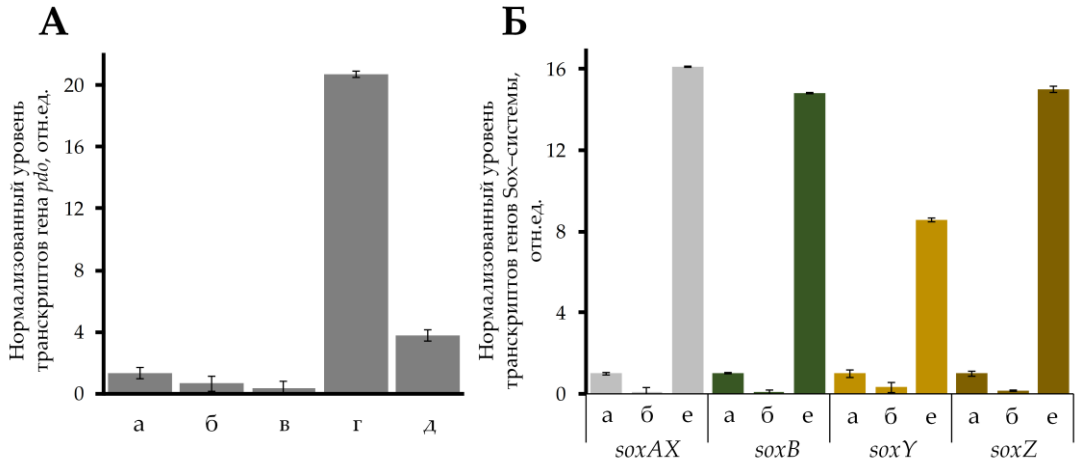


Рисунок 9 — Уровень экспрессии гена *pdo* (А) и генов Sox-системы (Б) у *B. leptomitoformis* D-402 при различных условиях роста

а — хемолитоавтотрофный рост в присутствии Na_2S, экспоненциальная фаза роста (3-и сутки); б — хемоорганогетеротрофный рост, экспоненциальная фаза роста (3-и сутки); в — хемолитоавтотрофный рост в присутствии внутриклеточной элементной серы (4-е сутки); г — хемолитоавтотрофный рост в присутствии внутриклеточной элементной серы (7-е сутки); д — хемолитоавтотрофный рост в присутствии внутриклеточной элементной серы (24-е сутки); е — хемолитоавтотрофный рост в присутствии внутриклеточной элементной серы (18-е сутки) (цит. по Rudenko *et al.*, 2024).

С учетом того, что после исчезновения внутриклеточной серы наблюдалось ее повторное накопление, был проведен анализ экспрессии генов Sox-системы. Максимальный уровень экспрессии был зарегистрирован на 18-е сутки культивирования на обедненной минеральной среде. Экспрессия генов *soxAX* и *soxB* превышала значения, полученные при хемолитоавтотрофном росте на сульфиде, в среднем в 15 раз, тогда как экспрессия *soxY* возрастала в 8,6 раза (Рисунок 9Б). При хемоорганогетеротрофном росте экспрессия генов Sox-системы находилась на уровне погрешности метода.

Полученные результаты позволяют предположить, что образующийся сульфит спонтанно взаимодействует с сульфановой серой с образованием тиосульфата, который затем окисляется разветвленной Sox-системой до сульфата и элементной серы. Такой механизм объясняет повторное накопление серных глобул в клетках штамма D-402.

Для проверки данной гипотезы были исследованы промежуточные продукты, образующиеся при хемолитоавтотрофном росте *B. leptomitoformis* D-402 в присутствии

внутриклеточной элементной серы и $NaHCO_3$. В течение первых семи суток наблюдалось практически полное исчезновение внутриклеточных серных глобул, что сопровождалось максимальным уровнем экспрессии гена *pdo*. Начиная с 14-х суток инкубации вновь регистрировалось накопление внутриклеточной элементной серы. Среди продуктов процесса были обнаружены тиосульфат и сульфат, тогда как сульфит не выявлялся. Вероятно, отсутствие сульфита было связано с его быстрым превращением в тиосульфат в результате неферментативного взаимодействия с сульфановой серой.

Таким образом, на основании полученных данных предложена схема превращения внутриклеточной элементной серы у *B. leptomitoformis* D-402. Предполагается, что после мобилизации внутриклеточной серы и образования низкомолекулярного персульфида PDO катализирует его кислородзависимое окисление до сульфита. Реакция PDO непосредственно не сопряжена с переносом электронов в дыхательную цепь. Сульфит, вероятно, неферментативно взаимодействует с сульфановой серой с образованием тиосульфата, который затем окисляется разветвленной Sox-системой (Рисунок 10). Последующее окисление тиосульфата представляет энергетически значимый этап превращения внутриклеточной серы.

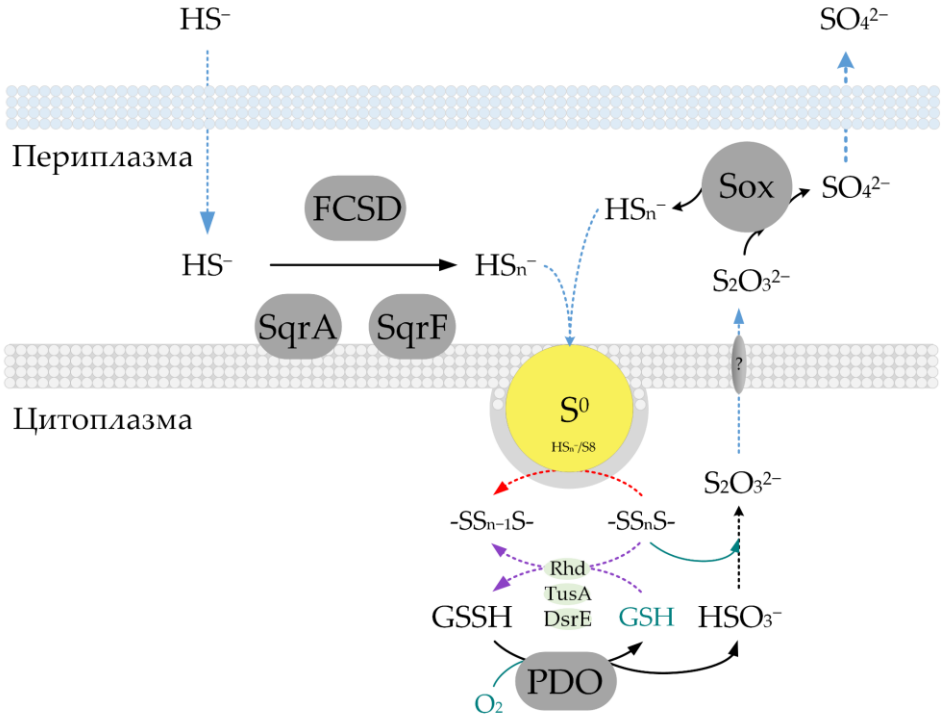
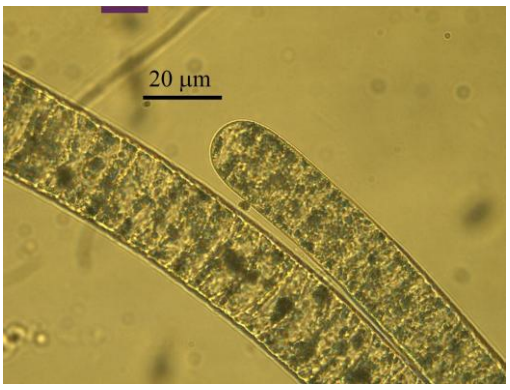


Рисунок 10 — Предполагаемая схема окисления сульфида у *B. leptomitoformis* D-402
Черной пунктирной линией обозначены неферментативные реакции, красной пунктирной линией — реакции, механизм которых в настоящее время не установлен, фиолетовой пунктирной линией обозначены реакции, отсутствующие у *B. leptomitoformis*. FCSD — флавоцитохром-с-сульфиддегидрогеназа; PDO — персульфиддиоксигеназа; SQR — сульфид:хиноноксидоредуктаза; GSH — глутатион; GSSH — глутатионперсульфид; HS^- — гидросульфид-ион; HS_n^- — гидрополисульфид-анионы, содержащие цепочку из n атомов серы ($n \geq 2$) (цит. по Rudenko *et al.*, 2024).

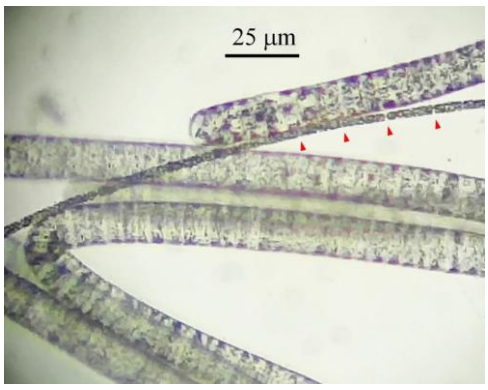
III. Филогеномика и метаболический потенциал представителей семейства *Beggiatoaceae*

Заключительный этап работы был посвящен филогеномному и сравнительному геномному анализу представителей семейства *Beggiatoaceae*. Необходимость такого анализа связана с тем, что большинство представителей семейства не получены в чистых культурах, а их таксономическое положение часто основано только на данных по гену 16S рРНК. В связи с этим для уточнения филогенетических взаимоотношений внутри семейства были использованы доступные геномные последовательности из базы GTDB, а также новые MAG, полученные из прибрежно-морских серных матов Белого моря.

Образцы серных матов были отобраны в бухте Белого моря «Ламинариевая помойка» вблизи Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова. Микроскопический анализ выявил два типа нитей бесцветных серобактерий: с крупными дисковидными клетками размером 18,0–20,0 × 8,0–10,0 мкм, образующими трихомы длиной до 900 мкм, и с цилиндрическими клетками размером 1,0–2,5 × 3,5–4,0 мкм, образующими трихомы длиной до 300 мкм. Оба типа характеризовались наличием внутриклеточных включений элементной серы и скользящей подвижностью; в крупных клетках предположительно присутствовали вакуоли (Рисунок 11а, б).



(а)



(б)

Рисунок 11 — Микроскопические изображения нитей из бактериальных серных матов, собранных в бухте Белого моря «Ламинариевая помойка»

Морфология нитчатых бесцветных серобактерий с крупными клетками **(а)** и клетками средних размеров **(б)**. Красными стрелками обозначены нити с клетками средних размеров (цит. по Ravin, Rudenko *et al*., 2024).

По результатам метагеномного секвенирования были собраны два MAG представителей *Beggiatoaceae*, обозначенные WS_Bin1 и WS_Bin3. MAG WS_Bin1 имел размер 8,64 млн п.н., полноту сборки 91,63 % и содержал 6942 потенциальных белок-кодирующих гена. MAG WS_Bin3 имел размер 3,64 млн п.н., полноту сборки 95,95 % и содержал 2800 потенциальных белок-кодирующих генов. Оба MAG содержали ген 16S рРНК, что позволило сопоставить результаты филогеномного анализа с ранее описанными кандидатными таксонами.

Анализ последовательности гена 16S рРНК показал, что MAG WS_Bin1 имеет 99,87 % сходства с видом “*Candidatus* Parabeggiatoa communis”, относящимся к роду “*Ca*. Parabeggiatoa”, ранее описанным Salman и соавт. в 2011 году (Salman *et al*., 2011; Konstantinidis *et al*., 2017). Геномные последовательности представителей этого рода ранее отсутствовали. В базе GTDB данный MAG был отнесен к кандидатному роду «UBA10656». Сравнение аминокислотных последовательностей показало, что значения

AAI (66,49–83,89 %) между WS_Bin1 и другими геномами группы «UBA10656» превышают порог, используемый для разграничения родов. На основании этого группа «UBA10656» была отнесена к ранее описанному роду "*Ca.* Parabeggiatoa", а MAG WS_Bin1 — к виду "*Candidatus* Parabeggiatoa communis".

Значения ANI между представителями рода "*Ca.* Parabeggiatoa" находились в диапазоне 75,15–88,76 %. Среди семи MAG, входящих в группу «UBA10656», полученные данные позволили выделить три новых вида в составе рода "*Ca.* Parabeggiatoa" — "*Ca.* Parabeggiatoa" sp. nov. 1 (MAG B3_G6), "*Ca.* Parabeggiatoa" sp. nov. 2 (MAG B38_G9 и 4572_84) и "*Ca.* Parabeggiatoa" sp. nov. 3 (MAG B5_G6, B2_G13 и B37_G9).

Согласно базе данных GTDB, MAG WS_Bin3 относится к семейству *Beggiatoaceae* и входит в состав кандидатного рода «BB20», представленного единственным геномом — MAG BB20. Значение ANI между двумя геномами составляет 84,23 %. Полученное значение позволяет отнести эти геномы к двум различным видам в составе нового рода "*Ca.* Albibeggiatoa" gen. nov. с предложенными названиями "*Ca.* Albibeggiatoa psychrophila" gen. nov., sp. nov. WS и "*Ca.* Albibeggiatoa" sp. nov. BB20.

Дополнительный поиск геномных последовательностей в базе данных GenBank позволил выявить геном *Thiotrichaceae* sp. R2S4C1D_S41.012. Значения ANI между данным геномом и геномами "*Ca.* Albibeggiatoa psychrophila" и "*Ca.* Albibeggiatoa" sp. nov. BB20 составили 79,9 % и 84,23 % соответственно, что позволило отнести *Thiotrichaceae* sp. R2S4C1D_S41.012 к новому виду рода "*Ca.* Albibeggiatoa" — "*Ca.* Albibeggiatoa" sp. nov. NOAA.

Положение геномов на филогенетическом дереве определяли на основе конкатенированных аминокислотных последовательностей 120 консервативных маркерных генов (Рисунок 12).

Таким образом, два кандидатных рода, «UBA10656» и «BB20», получили уточненный таксономический статус как "*Ca.* Parabeggiatoa" и "*Ca.* Albibeggiatoa" gen. nov.

Сравнительный анализ геномов позволил выявить основные сходства и различия в метаболизме представителей родов "*Ca.* Parabeggiatoa" и "*Ca.* Albibeggiatoa".

Энергетический метаболизм при гетеротрофном росте у представителей обоих родов включает цикл Кребса. Однако в отличие от представителей рода "*Ca.* Albibeggiatoa", у представителей рода "*Ca.* Parabeggiatoa" отсутствуют гены ключевых ферментов глиоксилатного цикла — малатсинтазы (*aceB*) и изоцитратлиазы (*aceA*), участвующих в анаболических и катаболических процессах.

Наличие генов ферментных систем, обеспечивающих окисление восстановленных соединений серы, включая сероводород (сульфид:хиноноксидоредуктаза (SQR) и флавоцитохром-с-сульфиддегидрогеназа (FCSD)) и тиосульфат (Sox-система), до сульфата и элементной серы, а также генов комплекса обратной диссимиляционной сульфитредуктазы (rDsr) для последующего окисления элементной серы, свидетельствует о потенциальной способности этих бактерий к литоавтотрофному росту. На это также указывает наличие генов цикла Кальвина–Бенсона–Бэссема; полный набор генов цикла выявлен у представителей рода "*Ca.* Parabeggiatoa", тогда как у "*Ca.* Albibeggiatoa psychrophila" WS ген фосфорибулокиназы *prk* не обнаружен.

Основные различия между родами "*Ca.* Parabeggiatoa" и "*Ca.* Albibeggiatoa" связаны с метаболизмом соединений азота. Полный набор генов денитрификации *narGHIJ, nirS, norBC* и *nosZ* выявлен у представителей "*Ca.* Parabeggiatoa" sp. nov. 2 и

“*Ca*. Parabeggiatoa” sp. nov. 3. Ген *nasA* в сочетании с генами *nirBD*, указывающий на потенциальную способность к ассимиляционному восстановлению нитрата до аммония, обнаружен у “*Ca*. Parabeggiatoa” sp. nov. 1, “*Ca*. Parabeggiatoa” sp. nov. 2 и “*Ca*. Parabeggiatoa” sp. nov. 3; у “*Ca*. Parabeggiatoa communis” WS_Bin1 ген *nasA* не выявлен. У представителей “*Ca*. Albibeggiatoa” BB20 и NOAA выявлены *nasA* и *nirBD*, тогда как в MAG WS ген *nasA* представлен двумя фрагментами, расположенными на разных контигах, а гены *nirBD* присутствуют. Полный набор генов фиксации молекулярного азота выявлен только в MAG BB20 и NOAA (Таблица 4).

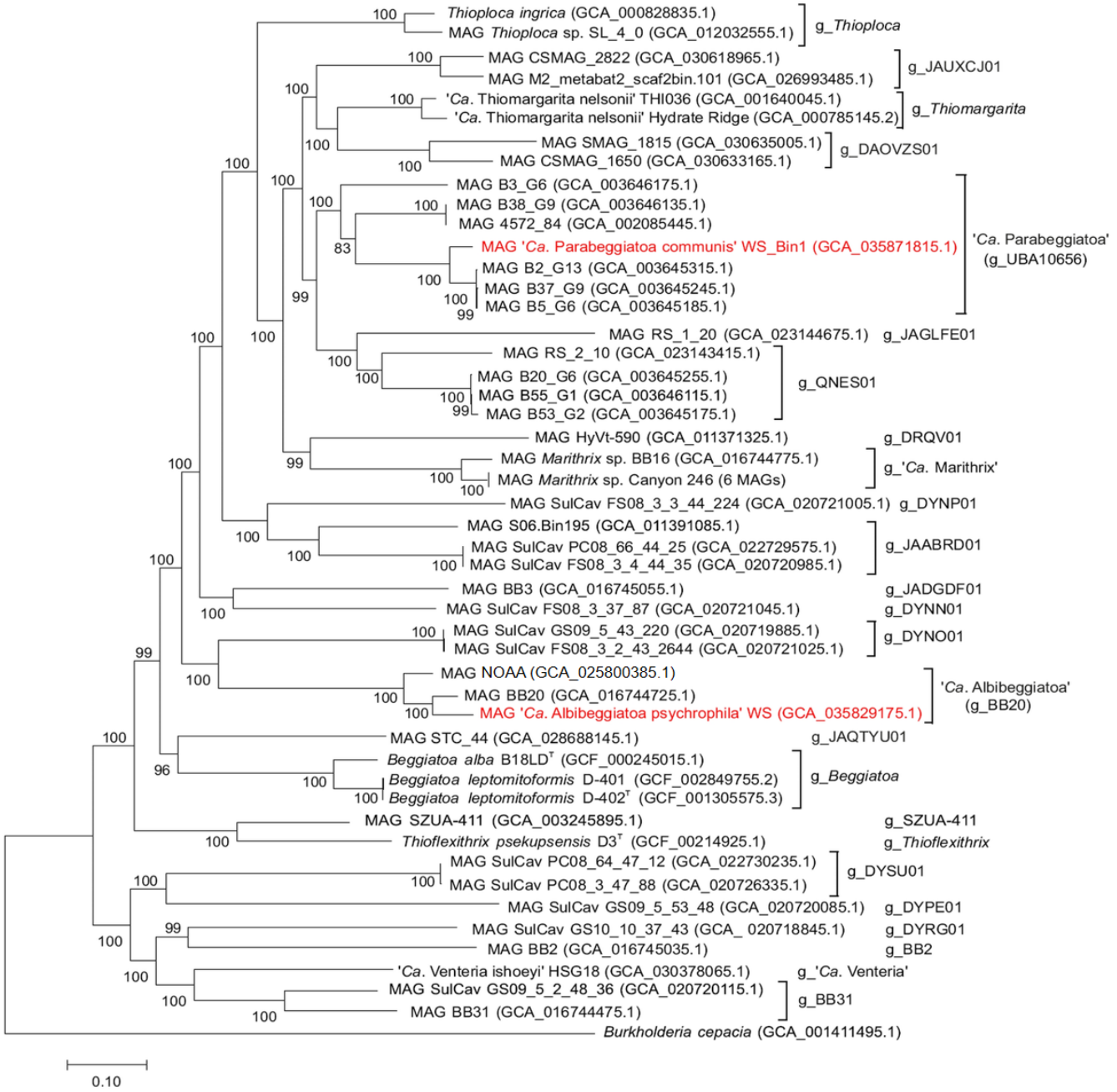


Рисунок 12 — Филогенетическое дерево представителей семейства *Beggiatoaceae*, построенное на основе геномных последовательностей

Положение геномов определяли методом максимального правдоподобия на основе конкатенированных аминокислотных последовательностей 120 консервативных маркерных генов. Два новых MAG, WS_Bin1 и WS_Bin3, обозначены красным шрифтом (цит. по Ravin, Rudenko *et al.*, 2024).

Таблица 4 — Характеристика основных метаболических путей представителей родов семейства *Beggiatoaceae*

Метаболические пути			“*Ca*. Parabeggiatoa”							“*Ca*. Albibeggiatoa”		
			WS_Bin1	Вид 3			Вид 1	Вид 2		WS	BB20	NOAA
				B5_G6	B2_G13	B37_G9	B3_G6	B38_G9	4572_84			
Азотный метаболизм	Денитрификация, нитратредуктаза семейства Nar	$NO_3^- \rightarrow NO^-_2$	*narGHIJ*	*narGHIJ*			*narGHIJ*	*narGHIJ*		–		
		$NO_2^- \rightarrow NO$	–	*nirS*			–	*nirS*				
		$NO \rightarrow N_2O$	*norBC*	*norBC*			*norBC*	*norBC*				
		$N_2O \rightarrow N_2$	–	*nosZ*			–	*nosZ*				
	Диссимиляционное восстановление NO_3^- до NH_4^+, нитратредуктаза семейства Nap		*napAB*	*nirBD*			*napAB, nirBD*			*napA, nirBD*	*napAB, nirBD*	
	Ассимиляционное восстановление NO_3^- до NH_4^+, нитратредуктаза семейства Nas			*nasA, nirBD*						*nasA, nirBD*		
	Фиксация молекулярного азота		–							–	*nifASUBXX2ENQVW MHDKZTO*	
Диссимиляционный метаболизм серы	Системы окисления сероводорода		*sqrAF, fccAB*	*sqrAF, fccAB*	*sqrAF, fccAB*	*sqrA, fccAB*	*fccAB*	*sqrAF, fccAB*	*sqrAF, fccAB*	*sqrF, fccAB*		
	Окисление тиосульфата, Sox-система		*soxAXBYZ*	*soxAXBYZ*	*soxAXYZ*	*soxAXBYZ*	*soxAXBY*	*soxAXBYZ*	*soxBYZ*	*soxAXBYZ*		
	Система окисления элементной серы, rDsr-система		*dsrABEFHCMKLJOPNRS*									
	Системы окисления сульфита	Прямой путь	*soeABC*	*soeABC*	*soeAB*	*soeA*	*soeA*	*soeABC*	*soeABC*	*soeABC*		
		Непрямой путь	*aprAB, sat*	*aprAB*	*aprAB*	*aprAB, sat*	*aprAB, sat*	*aprAB, sat*	*aprAB*	*sat*		
Углеродный метаболизм	Цикл Кребса		+							+		
	Глиоксилатный путь		–							+		
	Пентозофосфатный путь		+							+		
	Тип Рубиско		II				IAq			II		

narG — ген мембраносвязанной нитратредуктазы; *nirS* — ген диссимиляционной нитритредуктазы; *norBC* — гены цитохром-с-зависимой редуктазы оксида азота cNOR; *nosZ* — ген редуктазы закиси азота; *napAB* — гены периплазматической нитратредуктазы; *nirBD* — гены NADH-зависимой нитритредуктазы NirBD; *nasA* — ген ассимиляционной нитратредуктазы; кластер генов *nif* — гены нитрогеназы; *sqr* — ген сульфид:хиноноксидоредуктазы; *fccAB* — гены флавоцитохром-с-сульфиддегидрогеназы; *soxAXBYZ* — гены разветвленной Sox-системы; rDsr — комплекс окисления серы, кодируемый генами *dsrABEFHCMKLJOPNRS*; *soeABC* — гены хинонзависимой сульфитдегидрогеназы; *aprAB* — гены аденозин-5′-фосфосульфатредуктазы; *sat* — ген ATP-сульфурилазы. “*Ca*. Parabeggiatoa”: MAG WS_Bin1 — “*Ca*. Parabeggiatoa communis”; MAG B5_G6, B2_G13 и B37_G9 — “*Ca*. Parabeggiatoa” sp. nov. 3; MAG B3_G6 — “*Ca*. Parabeggiatoa” sp. nov. 1; MAG B38_G9 и 4572_84 — “*Ca*. Parabeggiatoa” sp. nov. 2. “*Ca*. Albibeggiatoa”: MAG WS — “*Ca*. Albibeggiatoa psychrophila” sp. nov.; MAG BB20 — “*Ca*. Albibeggiatoa” sp. nov.; MAG NOAA — “*Ca*. Albibeggiatoa” sp. nov. Знаками «+» и «−» обозначено наличие или отсутствие метаболического пути (цит. по Ravin, Rudenko *et al*., 2024).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нитчатые серобактерии семейства *Beggiatoaceae* играют важную роль в круговороте серы в водных экосистемах благодаря способности окислять восстановленные соединения серы и накапливать внутриклеточную элементную серу. Настоящая работа посвящена изучению механизмов накопления и окисления внутриклеточной элементной серы у *B. leptomitoformis*, а также филогенетического разнообразия и метаболического потенциала представителей семейства *Beggiatoaceae*.

Проведенное исследование позволило расширить представления о механизмах диссимиляционного серного метаболизма у бесцветных серобактерий семейства *Beggiatoaceae*. На примере штаммов *B. leptomitoformis* D-401 и D-402 показана связь функционирования предполагаемого белка оболочки серных глобул с накоплением внутриклеточной элементной серы и особенностями метаболизма восстановленных соединений серы. Установлено, что утрата данных свойств у штамма D-401 обусловлена нарушением соответствующего гена вследствие встраивания транспозона в кодирующую область гена.

У представителей семейства *Beggiatoaceae* диссимиляционное окисление элементной серы осуществляется при участии ферментных систем rDsrAB или sHdr, или SOR. Однако только у представителей рода *Beggiatoa* на протяжении полутора столетий не были выявлены пути превращения элементной серы.

В ходе работы исследован механизм окисления внутриклеточной элементной серы у *B. leptomitoformis* D-402. Впервые для *B. leptomitoformis* показано, что превращение внутриклеточной элементной серы протекает при участии персульфиддиоксигеназы, тогда как гены известных систем ее окисления rDsr и sHdr, сероокcигеназы/редуктазы SOR, а также полисульфидредуктазы PsrABC, участвующей в восстановлении полисульфидов до сульфида, в геноме штамма не выявлены. На основании геномного, протеомного, биохимического, структурного и транскрипционного анализа предложена схема окисления внутриклеточной элементной серы. Полученные результаты свидетельствуют о существовании у *B. leptomitoformis* циклического механизма ее превращения, включающего окисление с участием персульфиддиоксигеназы, образование тиосульфата и его последующее окисление Sox-системой. Такой механизм обеспечивает длительное сохранение элементной серы в клетке и ее повторное вовлечение в энергетический метаболизм при отсутствии внешних восстановленных соединений серы.

Филогеномный анализ представителей семейства *Beggiatoaceae* позволил уточнить таксономическое положение ряда кандидатных таксонов и расширить современные представления о разнообразии данной группы микроорганизмов. На основании анализа MAG уточнен статус представителей родов «UBA10656» и «BB20», первый был отнесен к роду “*Ca*. Parabeggiatoa” и второй был описан как новый род “*Ca*. Albibeggiatoa” с видом “*Ca*. Albibeggiatoa psychrophila” gen. nov., sp. nov. Сравнительный анализ геномов представителей родов “*Ca*. Parabeggiatoa” и “*Ca*. Albibeggiatoa” выявил некоторые различия в метаболизме азота и углерода.

Полученные результаты вносят вклад в понимание механизмов накопления и окисления внутриклеточной элементной серы у бесцветных серобактерий, в частности у *B. leptomitoformis*, а также расширяют современные представления о филогенетическом разнообразии семейства *Beggiatoaceae*.

ВЫВОДЫ

1. Полногеномное сравнение штаммов *B. leptomitoformis* D-401 и D-402^{T} выявило более 99,5 % сходства их геномов и 16 локусов, различавшихся наличием длинных вставок, 14 из которых имели транспозонную природу; при этом различий в кодирующих и промоторных областях генов диссимиляционного метаболизма серы выявлено не было.

2. У штамма *B. leptomitoformis* D-401 выявлена транспозонная вставка в гене, кодирующем белок, который предположительно выполняет функцию белка оболочки серных глобул у штамма D-402. Нарушение данного гена ассоциировано с неспособностью штамма накапливать внутриклеточную элементную серу.

3. Впервые у *B. leptomitoformis* выявлена и охарактеризована персульфиддиоксигеназа, участвующая в превращении внутриклеточной элементной серы с образованием сульфита. Установлено, что персульфиддиоксигеназа *B. leptomitoformis* относится к PDO I типа и катализирует кислородзависимое окисление глутатионперсульфида с удельной активностью около 2900 U·мг$^{-1}$. Максимальная активность фермента отмечена при pH 7,5 и температуре 40 °C. Впервые для представителя нитчатых бесцветных сероокисляющих бактерий определена кристаллическая структура PDO, депонированная в PDB под номером 8ZBD.

4. Предложена схема циклического превращения внутриклеточной серы у *B. leptomitoformis* D-402, основанная на функциональной связи PDO и Sox-системы; такой механизм позволяет использовать запасенную серу как эндогенный источник восстановленных соединений для энергетического метаболизма клетки при отсутствии внешних доноров электронов.

5. На основании филогеномного анализа новых MAG, полученных из метагеномов серных матов Белого моря, и доступных геномов определено таксономическое положение двух кандидатных родов семейства *Beggiatoaceae*. Установлено соответствие кандидатного рода «UBA10656» в классификации GTDB роду “*Ca*. Parabeggiatoa”, а геномы кандидатного рода «BB20» выделены в новый род “*Ca*. Albibeggiatoa”.

6. На основании филогеномного анализа установлено, что MAG WS_Bin1 относится к виду “*Ca*. Parabeggiatoa communis”, тогда как MAG WS_Bin3 представляет новый род и вид “*Ca*. Albibeggiatoa psychrophila” gen. nov., sp. nov. Установлено, что представители родов “*Ca*. Parabeggiatoa” и “*Ca*. Albibeggiatoa” обладают сходным набором генов, потенциально обеспечивающих литоавтотрофный рост за счет окисления восстановленных соединений серы, при этом выявлены различия в генетическом потенциале метаболизма соединений азота и углерода.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в научных журналах, индексируемых в международных реферативных базах данных:

1. **Rudenko T.S.**, Tarlachkov S.V., Shatskiy N.D., Grabovich M.Y. Comparative genomics of *Beggiatoa leptomitoformis* strains D-401 and D-402^T with contrasting physiology but extremely high level of genomic identity // Microorganisms. — 2020. — V. 8, № 6. — P. 928. doi: 10.3390/microorganisms8060928.
2. **Rudenko T.S.**, Trubitsina L.I., Terentyev V.V., Trubitsin I.V., Borshchevskiy V.I., Tishchenko S.V., Gabdulkhakov A.G., Leontievsky A.A., Grabovich M.Y. Mechanism of intracellular elemental sulfur oxidation in *Beggiatoa leptomitoformis*, where persulfide dioxygenase plays a key role // International Journal of Molecular Sciences. — 2024. — V. 25, № 20. — P. 10962. doi: 10.3390/ijms252010962.
3. Ravin N.V., **Rudenko T.S.**, Beletsky A.V., Smolyakov D.D., Mardanov A.V., Grabovich M.Y., Muntyan M.S. Phylogeny and metabolic potential of new giant sulfur bacteria of the family *Beggiatoaceae* from coastal-marine sulfur mats of the White Sea // International Journal of Molecular Sciences. — 2024. — V. 25, № 11. — P. 6028. doi: 10.3390/ijms25116028.

Тезисы докладов на российских и международных конференциях:

1. Мунтян М.С., **Руденко Т.С.**, Равин Н.В., Грабович М.Ю. Метаболический потенциал новых серных бактерий семейств *Beggiatoaceae* и *Thiotrichaceae* // Физико-химическая биология в год 270-летия МГУ. Сборник материалов международной научной конференции, посвященной 120-летию со дня рождения А.Н. Белозерского и 90-летию со дня рождения В.П. Скулачева, Москва, 20–22 февраля 2025 г. — Москва: Издательство Московского университета, 2025. — С. 132–133. ISBN 978-5-19-012229-9.
2. Грабович М.Ю., **Руденко Т.С.**, Смольяков Д.Д., Равин Н.В. Геномика и физиология нитчатых бесцветных серобактерий // Биоинформатика регуляции и структуры геномов / системная биология: Четырнадцатая международная мультиконференция: Тез. докл. (Россия, Новосибирск, 5–10 авг. 2024 г.). — Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2024. — С. 1390–1394. ISBN 978-5-91291-067-8.
3. **Руденко Т.**, Трубицина Л., Грабович М. Механизм окисления элементной серы у представителя нитчатых серобактерий из семейства *Beggiatoaceae* — *Beggiatoa leptomitoformis* // Тезисы 4-го Российского микробиологического конгресса (Томск, 24–29 сентября 2023 г.). — С. 151–152.
4. **Руденко Т.**, Тарлачков С., Трубицина Л., Грабович М. Новые аспекты метаболизма бесцветных нитчатых серобактерий // 3-й Российский микробиологический конгресс (г. Псков, 26 сен. – 1 окт. 2021 г.): материалы конгресса. — Псков: Псковский государственный университет, 2021. — С. 78–79. ISBN 978-5-00200-015-9.
5. **Rudenko T.**, Tarlachkov S., Grabovich M. Revealing of reasons for remarkable phenotypic differences between *Beggiatoa leptomitoformis* strains D-401 and D-402^T // FEMS 2020 ONLINE Conference on Microbiology (28–31 October 2020, Belgrade, Serbia). — P. 455.